

PCT/JP2004/004133

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

24.3.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年 3月26日

出願番号  
Application Number: 特願2003-086268  
[ST. 10/C]: [JP2003-086268]

出願人  
Applicant(s): クリングルファーマ株式会社  
中村 敏一

REC'D 21 MAY 2004

WIPO

PCT

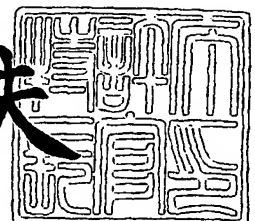
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 4月28日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願  
【整理番号】 DK12J937  
【提出日】 平成15年 3月26日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 A61K 38/18

A61P 37/08

【発明者】

【住所又は居所】 岡山市弓之町 1 5 - 2 8 - 4 0 2

【氏名】 金廣 有彦

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府高槻市高見台 4 - 1

【氏名】 中村 敏一

【発明者】

【住所又は居所】 岡山市今在家 3 0 4 - 2 - 2 0 4

【氏名】 谷本 光音

【発明者】

【住所又は居所】 岡山市学南町 3 - 1 3 - 1 8

【氏名】 伊藤 亘

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府箕面市小野原東 6 - 2 5 - 2 - 2 0 4

【氏名】 松本 邦夫

【特許出願人】

【識別番号】 502068908

【氏名又は名称】 クリングルファーマ株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 591115073

【氏名又は名称】 中村 敏一

## 【代理人】

【識別番号】 100077012

【弁理士】

【氏名又は名称】 岩谷 龍

【電話番号】 06-4796-1300

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 066372

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 喘息治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 HGF 又はその塩を有効成分として含有する喘息の予防又は治療剤。

【請求項 2】 HGF が、配列番号：1 若しくは 2 で表されるアミノ酸配列を含むペプチド、配列番号：1 若しくは 2 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含むペプチド又はこれらの部分ペプチドであることを特徴とする請求項 1 に記載の喘息の予防又は治療剤。

【請求項 3】 HGF をコードする DNA を有効成分として含有する喘息の予防又は治療剤。

【請求項 4】 HGF をコードする DNA が、配列番号：3 若しくは 4 で表される塩基配列を有する DNA 又は配列番号：3 若しくは 4 で表される塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA であることを特徴とする請求項 3 に記載の喘息の予防又は治療剤。

【請求項 5】 HGF をコードする DNA が、組換え発現ベクターに挿入されていることを特徴とする請求項 3 又は 4 に記載の喘息の予防又は治療剤。

【請求項 6】 組換え発現ベクターが、アデノ随伴ウイルス (AAV)、アデノウイルス、レトロウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス (HIV)、センダイウイルス、エプスタインバーウイルス (EBV)、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス、SV40、pCAGGS、pBK-CMV、pCDNA3.1 又は pZeoS V であることを特徴とする請求項 5 に記載の喘息の予防又は治療剤、

【請求項 7】 組換え発現ベクターが、更に宿主細胞に含まれていることを特徴とする請求項 5 又は 6 に記載の喘息の予防又は治療剤。

【請求項 8】 HGF をコードする DNA 又は HGF をコードする DNA を含む組換え発現ベクターが、リポソーム又はマイクロカプセルに含まれていることを特徴とする請求項 3～7 のいずれかに記載の喘息の予防又は治療剤。

【請求項 9】 更に薬剤学的に許容され得る担体を含むことを特徴とする請求

項 1 ～ 8 のいずれかに記載の喘息の予防又は治療剤。

【請求項 10】 HGF 又はその塩の有効量を、哺乳動物に投与することにより気道の炎症を抑制することを特徴とする喘息の予防又は治療方法。

【請求項 11】 HGF をコードする DNA の有効量を、哺乳動物に投与することにより気道の炎症を抑制することを特徴とする喘息の予防又は治療方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は喘息治療剤に関する。更に詳細には、気管支喘息における炎症反応を極めて有効に抑制し、しかも副作用のない安全な喘息の予防又は治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

現在社会においては、自動車や工場等からの排気ガス、化学物質、粉塵等による大気汚染が顕著となり、それに伴い気管支喘息の患者数が増えている。

気管支喘息とは、発作時に気管支平滑筋の収縮・攣縮が起こり、発作時は大変苦しい呼吸困難の状態に陥る重篤な疾患である。気管支喘息は、大人はもちろん子供でも入院原因の筆頭に挙げられる程であるが、現在の医療では、個々の患者の喘息に対応した予防も治療も難しい疾患とされている。

【0003】

気管支喘息は、一般的には化学伝達物質やその他の因子に対する気道過敏性等の体質的素因に、抗原刺激等（例えば、上記の排気ガス、化学物質等）の誘因が加わって発症するものと考えられている。その病態生理は複雑で、様々な要因、例えば、活性化された好酸球やTリンパ球等の炎症細胞の気管支粘膜細胞内への流入、その際にTh2サイトカイン、特にIL-4、IL-5、IL-13、及びグロースファクター、例えば血小板由来増殖因子（PDGF）、神経増殖因子（NGF）、変形増殖因子（TGF- $\beta$ ）、中でも特にTGF- $\beta$ が、一連の炎症反応を亢進化するのに重要な役割を果たしている等といった事実が多数の研究により示されているが、そのメカニズムの全容は未だ明らかとはなっていない。

## 【0004】

炎症が頻発し、しかもその治療が不完全な状態で長期間続くと、例えば上皮組織の線維化や、杯細胞、筋線維芽細胞の過増殖等が起こり、その結果、気道は不完全修復（remodeling：リモデリング）の形で再生する。ひとたび不完全修復が起きてしまうと、気管支粘膜は線維質に置き換わり、その弾力性を失うために、気道の可逆性が失われ、喘息の慢性化・難治化を招くこととなる。

## 【0005】

現在このような慢性的な気管支喘息の治療には、副腎皮質ホルモン剤、いわゆるステロイド剤が主に使用されている。しかし、この薬剤は治療には有効ではあるが、その副作用が問題となっている。例えば、効力のある抗喘息薬として知られているグルココルチコステロイドは、実際は一時的な症状鎮静効果しか有せず、その代償として周知の副作用、例えば骨粗鬆症、肥満、高血圧、糖尿病等を伴う（例えば、非特許文献1参照）。そのステロイドによる副作用を軽減すべく開発された吸入ステロイド療法も、合併症を発症する等の危険がある（例えば、非特許文献2参照）。特にステロイドの副作用がひどい患者向けにはステロイド代替薬として低用量メトトレキセートが提案されてきた（例えば、非特許文献3）が、メトトレキセートそれ自体がかなりの毒性を有している。

また、気管支を拡張させる即効性のある薬剤、例えば $\beta$ 2刺激剤等もあるが、これは心臓にも作用するので、心臓疾患のある患者には用いる事ができず、しかも使用回数が制限される。

## 【0006】

従って、既存のどの抗喘息剤又は喘息療法も、その効果及び安全面において不完全で、かつ持続的な寛解は報告されていない。よって患者に無害で、しかも持続的な抗炎症効果を奏するような気管支喘息の治療剤及び療法が必要とされている。

## 【0007】

肝細胞増殖因子（HGF）とは、N末端ヘアピンドメインと4つのクリングルドメインからなる $\alpha$ 鎖と、 $\beta$ 鎖とで構成されるヘテロダイマータンパクをいう。HGFは、種々の上皮細胞系において、上皮-間葉相互作用の仲介役を担う重要

な因子であることが知られている。例えば、HGFは、腫瘍細胞の浸潤、転移等を誘発するマイトゲン活性、モートゲン活性、モルフォゲン活性及び血管新生作用を有することが知られており（例えば、非特許文献4又は非特許文献5参照）、また組換えHGFをヒト等に投与することにより、肝臓、腎臓、肺や心筋の線維化（例えば肝臓では肝硬変）の発症を防いだり、進行を阻止したりすることも知られている（例えば、非特許文献6参照）。

#### 【0008】

HGFは、上述したように様々な生物活性を有するが、喘息による気道の炎症を抑制する効果をも有することはこれまでに全く知られておらず、本発明において初めて明らかとなった。

#### 【0009】

従って、本発明は、このHGFの気道炎症抑制効果を発見した点において重要な発明であり、しかも本発明の喘息治療剤は、その構成成分を生体由来のHGFとする点で、上記したステロイド剤等を用いるよりも生体に安全で、しかもその投与による副作用発症の危険性がないため、非常に優れた発明であると言える。

#### 【0010】

##### 【非特許文献1】

バーンズ (Barnes, P.J.) 著、「喘息治療への新規アプローチ (A new approach to the treatment of asthma)」、ニューイングランドジャーナルオブメディスン (N Engl J Med)、米国、マサチューセッツメディカルソサイエティ (Massachusetts Medical Society)、1989年11月30日、第321巻、p 1517-1527

##### 【非特許文献2】

ツグッド (Toogood, J.H.) 著、「慢性喘息に対するエアロゾルステロイド (ブデソナイド) の投与頻度と投与時期の影響 (Influence of dosing frequency and schedule on the response of chronic asthmatics to the aerosol steroid, budesonide)」、ジャーナルオブアレルギーアンドクリニカルイムノロジー (Journal of Allergy and Clinical Immunology)、米国、1982年、第70巻、p 388-398

## 【非特許文献 3】

マラーキー (Mullarkey, M. F.) 著、「コルチコステロイド依存型喘息におけるメトトレキサートの影響 ダブルブラインドクロスオーバー試験 (Methotrexate in the treatment of corticosteroid-dependent asthma. A double-blind crossover study)」、ニューイングランドジャーナルオブメディシン (N. Engl. J. Med.)、米国、マサチューセッツメディカルソサイエティ (Massachusetts Medical Society)、1988年3月10日、第318巻、p 603-607

## 【非特許文献 4】

中村敏一著、「ラット血小板由来の HGF の精製及びサブユニット構造 (Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets)」、フェブスレター (FEBS letter)、米国、1987年、第224巻、p 311-316

## 【非特許文献 5】

チャン. W.Gら (Jiang. W.G et al.)、クリティカルレビューインオンコロジー／ヘマトロジー (Crit. Rev. Oncol. Hematol.)、1999年、第29巻、p 209-248

## 【非特許文献 6】

植木孝治ら、「ラット肝硬変に対する HGF による遺伝子治療 (Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats)」、ネイチャーメディシン (Nature Medicine)、1999年、第5巻、p 226-230

## 【0011】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は喘息治療剤、詳しくは、気管支喘息における炎症反応を極めて有効に抑制する HGF を含有し、しかも投与による副作用がなく、生体に安全な喘息治療剤を提供することを目的とする。

## 【0012】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を重ねた。具体的には、本発明



者らは、抗原吸入暴露した卵白アルブミン感作マウスにHGFを投与すると、炎症時に見られる好酸球やリンパ球等の炎症細胞の流入が阻止され、しかも気管支肺胞洗浄液中のIL-4、IL-5並びにIL-13等のTh2サイトカイン及び血小板由来増殖因子(PDGF)、神経増殖因子(NGF)等のグロースファクターの濃度の上昇が顕著に抑制されるということを発見し、喘息等の気道炎症の治療・予防にHGFを用いることが有効であることを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づいて更なる検討を重ね、本発明を完成するに至った。

### 【0013】

すなわち、本発明は、

- (1) HGF又はその塩を有効成分として含有する喘息の予防又は治療剤、
- (2) HGFが、配列番号：1若しくは2で表されるアミノ酸配列を含むペプチド、配列番号：1若しくは2で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含むペプチド又はこれらの部分ペプチドであることを特徴とする前記(1)に記載の喘息の予防又は治療剤、
- (3) HGFをコードするDNAを有効成分として含有する喘息の予防又は治療剤、
- (4) HGFをコードするDNAが、配列番号：3若しくは4で表される塩基配列を有するDNA又は配列番号：3若しくは4で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであることを特徴とする前記(3)に記載の喘息の予防又は治療剤、
- (5) HGFをコードするDNAが、組換え発現ベクターに挿入されていることを特徴とする前記(3)又は(4)に記載の喘息の予防又は治療剤、
- (6) 組換え発現ベクターが、アデノ随伴ウイルス(AAV)、アデノウイルス、レトロウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス(HIV)、センダイウイルス、エプスタインバーウイルス(EBV)、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス、SV40、pCAGGS、pBK-CMV、pCDNA3.1又はpZeoSVであることを特徴とする前記(5)に記載の喘息の予防又は治療剤、
- (7) 組換え発現ベクターが、更に宿主細胞に含まれていることを特徴とす

る前記(5)又は(6)に記載の喘息の予防又は治療剤、

(8) HGFをコードするDNA又はHGFをコードするDNAを含む組換え発現ベクターが、リポソーム又はマイクロカプセルに含まれていることを特徴とする前記(3)～(7)のいずれかに記載の喘息の予防又は治療剤、

(9) 更に薬剤学的に許容され得る担体を含むことを特徴とする前記(1)～(8)のいずれかに記載の喘息の予防又は治療剤、

(10) HGF又はその塩の有効量を、哺乳動物に投与することにより気管支の炎症を抑制することを特徴とする喘息の予防又は治療方法、

(11) HGFをコードするDNAの有効量を、哺乳動物に投与することにより気管支の炎症を抑制することを特徴とする喘息の予防又は治療方法、に関する。

#### 【0014】

##### 【発明の実施の形態】

本発明は、HGF又はその塩を有効成分として含有することを特徴とする。

HGF又はその塩は、哺乳動物、例えばヒト、モルモット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サル等由来のいずれであってもよい。またHGFは、これらの哺乳動物の組織または細胞、例えば成熟肝細胞や血小板等から抽出される精製タンパク質であっても、遺伝子組み換え技術等を用いて、HGFをコードするDNA又はRNAを導入された形質転換細胞等を培養し、産生されるタンパク質を精製することによって得られる組換えタンパク質であっても、また化学的に合成される合成ポリペプチドであってもよい。成熟肝細胞や形質転換細胞等からのHGFの抽出・精製又は合成ポリペプチドの製造は、それ自体公知の方法に従って行われて良い。

#### 【0015】

ヒト等の哺乳動物の細胞からHGFを単離・精製する方法としては、例えば、比較的高濃度にHGFを含むラット血小板をトロンビン処理し、血小板外へ分泌されるHGFを取得後、イオン交換クロマトグラフィー、ヘパリンセファロースによるアフィニティクロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー等を用いて精製する方法等が挙げられる。

## 【0016】

また、遺伝子組み換え技術等を用いて、HGFをコードするDNA又はRNAを導入された形質転換細胞等を培養し、分泌されるタンパク質を精製することによってHGFを得る場合は、以下の方法に従って行うのがよい。

HGFをコードするDNA又はRNAを、適当な組換え発現ベクター、例えば pCAGGS (Gene, 108, 193-200 (1991)) 等に挿入し、これを宿主細胞に導入して形質転換体を構築する。

組換え発現ベクターを宿主へ導入する方法としては、自体公知の方法であればいずれも用いることができる。例えば、コンピテント細胞法[J. Mol. Biol., 53, 154(1970)]、DEAEデキストラン法[Science, 215, 166, (1982)]、インビトロパッケージング法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 72, 581 (1975)]、ウイルスベクター法[Cell, 37, 1053 (1984)]、マイクロインジェクション法[Exp. Cell. Res., 153, 347 (1984)]、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法[Science, 221, 551 (1983)]、リポフュージョン法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)]、プロトプラスト法[特開昭63-2483942、Gene, 17, 107 (1982)、Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)]に記載の方法等を挙げることができる。

## 【0017】

宿主としては、細菌、酵母、糸状菌、植物細胞、哺乳動物細胞等が挙げられる。例えば、細菌としては、エッシェリシア属 (Escherichia)、エンテロバクター属 (Enterobacter)、プロテウス属 (Proteus)、サルモネラ属 (Salmonella)、セラチア属 (Serratia)、バチラス属 (Bacillus)、ラクトバチラス属 (Lactobacillus)、ビフィドバクテリウム属 (Bifidobacterium)、シュードモナス属 (Pseudomonas)、ストレプトミセス属 (Streptomyces)、ストレプトコッカス属 (Streptococcus)、ロイコノストック属 (Leuconostoc)、ペディオコッカス属 (Pediococcus) 等が挙げられる。

酵母としては、サッカロミセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、シズサッカロミセス ポンベ (Schizosaccharomyces pombe)、NCYC1913、NCYC2036、ピキア パストリス (Pichia pastoris)、パン酵母等

が挙げられる。糸状菌としては、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*) 等が挙げられる。

植物細胞としては、ワタ、トウモロコシ、ポテト、ソラマメ、ペチュニア、トマト、タバコ等が挙げられる。哺乳動物細胞としては、マウス C127 細胞、チャイニーズハムスター CHO 細胞、サル COS 細胞、マウス細胞 BALB/3T3、マウス L 細胞、マウス AtT-20、マウスミエローマ細胞、ラット GH3、ヒト細胞 HeLa、ヒト FL 細胞、ヒト胎児腎臓由来の 293 細胞 [実験医学, 12, 316 (1994)] 等が挙げられる。

#### 【0018】

得られた形質転換体は、組換え HGF を産生するために、その宿主に応じた適切な培地で培養される。培地には該形質転換体の生育に必要な炭素源、無機物、ビタミン、血清及び薬剤等が含有される。

形質転換体の宿主が大腸菌の場合、LB 培地 (日水製薬)、M9 培地 [J. Exp. Mol. Genet., Cold Spring Laboratory, New York, 431 (1972)] 等が、宿主が酵母の場合、YEPD 培地 [Genetic Engineering, vol. 1, Plenum Press, New York, 117 (1979)] 等が、宿主が動物細胞の場合、20% 以下のウシ胎仔血清を含有する MEM 培地、DMEM 培地、PRMI 1640 培地 (日水製薬) 等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。形質転換体の培養は、通常 20℃～45℃、pH は 5～8 の範囲で行われ、必要に応じて通気・攪拌が行われるが、これらに限定されるものではない。また、宿主が接着性の動物細胞等の場合は、所望によりガラスビーズ、コラーゲンビーズ、アセチルセルロースフォローファイバー等の担体を用いられる。

#### 【0019】

組換え HGF を産生している形質転換体は、その培養液上清中に組換え HGF を分泌することから、この形質転換体の培養上清を用いて組換え HGF の抽出を行うことができる。また、形質転換体中に産生された組換え HGF の抽出を行うこともできる。タンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するには、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチーム又は／及び凍結融解等によって菌体あるいは細胞を破壊した後、遠心

分離や濾過により組換え HGF の粗抽出液を得る方法等が適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジン等のタンパク質変性剤や、トリトン X-100<sup>TM</sup> 等の界面活性剤が含まれていてもよい。このようにして得られた培養上清、あるいは細胞抽出液中に含まれる組換え HGF の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法等の溶解度を利用する方法、透析法、限外濾過法、ゲル濾過法及び SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法等の主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー等の荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィー等の特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィー等の疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法等の等電点の差を利用する方法等が用いられる。

#### 【0020】

配列番号：1 又は 2 で表されるアミノ酸配列は、HGF のアミノ酸配列の例である。配列番号：2 で表されるアミノ酸配列は、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列の 161～165 番目の 5 個のアミノ酸残基が欠失しているものであるが、配列番号：1 又は 2 で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質は、両者ともヒト由来の天然 HGF であって、HGF としてのマイトゲン活性、モートゲン活性等を有する。

配列番号：1 又は 2 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列を含むペプチドとしては、配列番号：1 又は 2 で表されるアミノ酸配列と少なくとも約 70% 以上、好ましくは約 80%、更に好ましくは約 90% 以上、最も好ましくは約 95% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチド、例えば配列番号：1 又は 2 で表されるアミノ酸配列から、1～数個のアミノ酸残基を挿入又は欠失させたアミノ酸配列、1～数個のアミノ酸残基を別のアミノ酸残基と置換させたアミノ酸配列、1～数個のアミノ酸残基が修飾されたアミノ酸配列等を含むペプチドであって、喘息時における気道炎症抑制作用を有するペプチドであることが好ましい。挿入されるアミノ酸又は置換されるアミノ酸は、遺伝子によりコードされる 20 種類のアミノ酸以外の非天然アミノ酸であってもよい。

これらのペプチドは、単独であっても、挿入や欠失、置換等を組み合わせたア

ミノ酸配列を含有するペプチドであっても、またこれらの混合ペプチドであってもよい。

#### 【0021】

本発明に用いられるHGFは、C末端がカルボキシル基(—COOH)、カルボキシレート(—COO<sup>-</sup>)、アミド(—CONH<sub>2</sub>)またはエステル(—COOR)の何れであってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC<sub>1</sub>—6アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC<sub>3</sub>—8シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどのC<sub>6</sub>—12アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル—C<sub>1</sub>—2アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル—C<sub>1</sub>—2アルキル基などのC<sub>7</sub>—14アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。本発明で用いられるHGFが、C末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明におけるHGFに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。さらに、本発明に用いられるHGFには、上記したタンパク質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチルなどのC<sub>2</sub>—6アルカノイル基などのC<sub>1</sub>—6アシル基など)で保護されているもの、N末端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば、—OH、—SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチルなどのC<sub>2</sub>—6アルカノイル基などのC<sub>1</sub>—6アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

#### 【0022】

本発明で用いるHGFの部分ペプチド(以下、部分ペプチドと略記する場合がある)としては、上記したHGFの部分ペプチドであればいずれのものであってもよい。本発明において、部分ペプチドのアミノ酸の数は、上記したHGFの構

成アミノ酸配列のうち少なくとも約20個以上、好ましくは約50個以上、より好ましくは約100個以上のアミノ酸配列を含有するペプチドなどが好ましい。本発明の部分ペプチドにおいては、C末端がカルボキシル基 ( $-COOH$ )、カルボキシレート ( $-COO^-$ )、アミド ( $-CONH_2$ ) またはエステル ( $-COOR$ ) の何れであってもよい。さらに、部分ペプチドには、上記したHGFと同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N末端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

#### 【0023】

本発明に用いられるHGFまたはその部分ペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが挙げられる。

#### 【0024】

本発明に用いられるHGFの部分ペプチドまたはその塩は、公知のペプチドの合成法に従って、あるいはHGFを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれでも良い。すなわち、HGFを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は、保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチドシンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)、SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)等に記載された方法が挙げられる。

また、反応後は通常の精製方法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせてHGFの部分ペ

プチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

#### 【0025】

本発明は、HGFをコードするDNAをその有効成分として含有することもできる。

本発明で用いられるHGFをコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて、直接RT-PCR法によって増幅し、得ることもできる。具体的には、HGFをコードするDNAとしては、例えば、

(a) 配列番号：3又は4で表わされる塩基配列を有するDNA、または(b) 配列番号：3又は4で表わされる塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、HGFと実質的に同質の活性、例えばマイトゲン活性、モートゲン活性等を有するタンパク質をコードするDNA等が挙げられる。なお、配列番号：3又は4で表わされる塩基配列を有するDNAとハイブリダイズするDNAとは、例えば上記DNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味する。具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、約0.7～1.0M程度の塩化ナトリウム存在下、約65℃程度でハイブリダイゼーションを行った後、約0.1～2倍程度の濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、約65℃程度の条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAを挙げることができる。

上記の配列番号：3又は4で表される塩基配列を有するDNAとハイブリダイズするDNAとして具体的には、配列番号：3又は4で表わされる塩基配列と約



70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を有するDNA等が挙げられる。ハイブリダイゼーションは、公知の方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning, A laboratory Manual, Third Edition (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001: 以下、モレキュラー・クローニング第3版と略す) に記載の方法等に従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

#### 【0026】

本発明で用いられるHGFの部分ペプチドをコードするDNAとしては、上記した部分ペプチドをコードする塩基配列を有するDNAであればいかなるものであってもよい。また、上記のHGFをコードするDNAと同様に、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものを用いて、直接RT-PCR法によって増幅することもできる。具体的な本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、(a) 配列番号：3又は4で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、(b) 配列番号：3又は4で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、HGFと実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNA、または上記(a) 或いは(b) の部分塩基配列を有するDNA等が挙げられる。

#### 【0027】

本発明で用いられるHGFまたは部分ペプチドをコードするRNAも、逆転写酵素によりHGFまたは部分ペプチドを発現することができるものであれば、本発明に用いることができ、本発明の範囲内である。また該RNAも公知の手段により得ることができる。

## 【0028】

本発明に用いられるHGF又はその部分ペプチド（以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のタンパク質の部分塩基配列を含有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAの中から、標識されたHGFの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて、ハイブリダイゼーションさせることによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング第3版に記載の方法等に従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

また、公知のHGFの塩基配列情報から従来公知の方法を用いて化学合成によりクローニングすることもできる。化学合成法としては、例えば、フォスフォアミダイト法を利用したDNA合成機 model 392（パーキン・エルマー株式会社製）等のDNA合成機で化学合成する方法等が挙げられる。

## 【0029】

DNAの塩基配列の置換は、PCRや公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-super Express Km（宝酒造）、Mutan<sup>TM</sup>-K（宝酒造）等を用いて、ODA-LA PCR法、gapped duplex法、Kunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行うことができる。クローン化された本発明のタンパク質をコードするDNAは、目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

## 【0030】

本発明に用いられるHGFをコードするDNA又はRNA（以下、本発明のDNA等と略記する場合がある）は、細胞内でのその安定性を高めるため、また、もし毒性があるならその毒性をより小さなものにするために修飾されていてもよい。このような修飾には、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol

.8, p247 (1992) ; Vol.8, p395 (1992) ; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press (1993)等に記載された方法等が挙げられる。本発明のDNA等は、リボソームまたはミクロスフェアなどに内包された特殊な形態で用いられてもよい。また、本発明に用いられるHGFをコードするDNA等は、塩基以外の他の物質が付加されたものであってもよい。前記他の物質としては、糖；酸または塩基；リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体；または、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸等）などが挙げられる。前記他の物質は、核酸の3'末端あるいは5'末端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。本発明のDNA等は、その末端が化学修飾されたものであってもよい。末端の修飾基としては、核酸の3'末端あるいは5'末端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNAseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

#### 【0031】

本発明に用いられるHGF或いはその部分ペプチドをコードするDNAは、組換え発現ベクターに含有されていてもよい。

組換え発現ベクターとしては、HGF又はその部分ペプチドを発現することができる発現ベクターが好ましい。

本発明に用いられる組換え発現ベクターは、例えば、HGFをコードする塩基配列を有するDNA断片を、適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

#### 【0032】

前記組換え発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pCR4、

pCR2.1、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、アデノウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス(HIV)、センダイウイルス、エプスタインバーウイルス(EBV)、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス、SV40等のウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。中でも、ウイルスが好ましく、アデノ随伴ウイルス(AAV)、アデノウイルス、レトロウイルス、またはポックスウイルス、ヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス(HIV)、センダイウイルス、エプスタインバーウイルス(EBV)、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス、SV40等が好ましい。更にアデノ随伴ウイルス(AAV)若しくはアデノウイルス等を用いることがより好ましい。アデノウイルスには種々の血清型が存在するが、本発明では2型若しくは5型ヒトアデノウイルスを使用することが好ましい。

### 【0033】

前記プロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。これらのうち、CMVプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$ PLプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーター

などが好ましい。

#### 【0034】

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジンなどを有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、*dhfr*と略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、*Amp<sup>r</sup>*と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、*Neor*と略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、*dhfr* 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHOを用いて *dhfr* 遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。また、所望により、宿主に合ったシグナル配列を発現ベクターに付加してもよい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、*PhoA*・シグナル配列、*OmpA*・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、*MF $\alpha$* ・シグナル配列、*SUC2*・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターを宿主に導入することにより、形質転換体を製造することができる。

#### 【0035】

上記HGF或いはその部分ペプチドをコードするDNAを含有する組換え発現ベクターは、更に宿主細胞に導入されていてもよい。

上記組換え発現ベクターの宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、ビフィズス菌、乳酸菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌の具体例としては、*Escherichia coli* K12・DH1〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60巻, 160 (1968)〕、JM103〔Nucleic Acids Research〕, 9巻, 309 (1981)〕, JA221〔Journal of Molecular Biology, 120巻, 517 (1978)〕、HB101〔Journal of Molecular Biolog

y

, 41巻, 459 (1969))、C 6 0 0 [Genetics, 39巻, 440 (1954)]、D H 5  $\alpha$  [Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H., Gene, 96, 23-28 (1990)]、D H 1 0 B [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87巻, 4645-4649 (1990)]等が用いられる。バチルス属菌としては、例えば、Bacillus subtilis M I 1 1 4 [Gene, 24巻, 255 (1983)、Journal of Biochemistry, 95巻, 87 (1984)]等が用いられる。ビフィズス菌としては、例えばBifidobacterium longum、Bifidobacterium bifidum、Bifidobacterium breve等が挙げられる。乳酸菌としては、例えばラクトバチラス属 (Lactobacillus)、ストレプトコッカス属 (Streptococcus)、ロイコノストック属 (Leuconostoc)、ペディオコッカス属 (Pediococcus) 等が挙げられる。酵母としては、例えばSaccharomyces cerevisiae A H 2 2、A H 2 2 R<sup>-</sup>、N A 8 7 - 1 1 A、D K D - 5 D、2 0 B - 1 2、Schizosaccharomyces pombe N C Y C 1 9 1 3、N C Y C 2 0 3 6、Pichia pastoris等が用いられる。

## 【 0 0 3 6 】

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがA c N P Vの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; S f細胞)、Trichoplusia niの中腸由来のM G 1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh Five<sup>TM</sup>細胞、Mamestrab brassicae由来の細胞またはEstigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがB m N P Vの場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N; B m N細胞) などが用いられる。該S f細胞としては、例えば、S f 9細胞 (ATCC CRL1711)、S f 2 1細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、In Vivo, 13, p213-217 (1977)) などが用いられる。昆虫としては、例えば、カイコの幼虫等が用いられる (前田ら、Nature, 315, 592 (1985))。

動物細胞としては、例えば、サル細胞C O S - 7、V e r o、チャイニーズハムスター細胞C H O (以下、C H O細胞と略記)、d h f r遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞C H O (以下、C H O (d h f r<sup>-</sup>)細胞と略記)、マウスL細胞、マウスA t T - 2 0、マウスミエローマ細胞、ラットG H 3、ヒトF L細胞などが用いられる。

## 【 0 0 3 7 】

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, p2110 (1972) や Gene, 17, p107 (1982) 等に記載の方法に従って行うことができる。バチルス属菌を形質転換するには、例えば、Molecular & General Genetics, 168, p111 (1979) 等に記載の方法に従って行うことができる。酵母を形質転換するには、例えば、Methods in Enzymology, 194巻, p182-187 (1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, p1929 (1978) 等に記載の方法に従って行うことができる。

#### 【0038】

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、Bio/Technology, 6, p47-55 (1988) 等に記載の方法に従って行うことができる。動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコール, p263-267 (1995) (秀潤社発行)、Virology, 52巻, p456 (1973) 等に記載の方法に従って行うことができる。このようにして、本発明のタンパク質をコードする DNA を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。宿主がエシェリヒア属菌またはバチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地の pH は約 5～8 が望ましい。

#### 【0039】

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含む M9 培地 [Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, p431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1972)] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 $\beta$ -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属

菌の場合、培養は通常約 15～43℃で約 3～24 時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約 30～40℃で約 6～24 時間行い、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 77, p4505 (1980)] や 0.5% カザミノ酸を含有する SD 培地 [Bitter, G. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, p5330 (1984)] 等が挙げられる。培地の pH は約 5～8 に調整するのが好ましい。培養は通常約 20℃～35℃で約 24～72 時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

#### 【0040】

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., Nature, 195, p788 (1962)) に非動化した 10% ウシ血清等の添加物を適宜加えたもの等が用いられる。培地の pH は約 6.2～6.4 に調整するのが好ましい。培養は通常約 27℃で約 3～5 日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約 5～20% の胎児牛血清を含む MEM 培地 [Science, 122, p501 (1952)]、DMEM 培地 [Virology, 8, p396 (1959)]、RPMI 1640 培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, p519 (1967)]、199 培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, p1 (1950)] 等が用いられる。pH は約 6～8 であるのが好ましい。培養は通常約 30℃～40℃で約 15～60 時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に HGF を生成せしめることができ、生体に有効に HGF を投与することができる。

#### 【0041】

組換え発現ベクターを宿主細胞に形質転換せず、裸のベクターとして生体に *in vivo* 導入し、本発明に用いることもできる。裸のベクターとして用いる場合、使用される組換え発現ベクターとしては、pCAGGS [Gene, 108, p193-200 (1991)]、pBK-CMV、pCDNA3.1、pZeoSV (インビトロ



ゲン社、ストラジーン社)等のプラスミドを用いることができる。該ベクターにも、前記SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター等、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジンなどを含有させることができる。

#### 【0042】

また、HGFをコードするDNA等又はHGFをコードするDNAを有する組換え発現ベクターを、リポソーム、マイクロカプセル、サイトフェクチン、DNA-タンパク質複合体、バイオポリマー等の人工ベクターに含有させることもできる。

#### 【0043】

リポソームとは、内部に水層を有する脂質二重膜でできた閉鎖小胞体であり、その脂質二分子膜構造が、生体膜に極めて近似していることが知られている。リポソームを製造するに際し使用されるリン脂質としては、例えば、レシチン、リゾレシチン等のホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール等の酸性リン脂質、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリン等のスフィンゴリン脂質等が挙げられる。また、コレステロール等を添加することもできる。リポソームは、自体公知の方法に従って製造することができる。リポソームには、膜融合リポソーム、HVJ-膜融合リポソーム [Kaneda, Y et al., Biol. Chem, 264, p12126-12129 (1989)、Kato, K et al., Biol. Chem, 266, p3361-3364 (1991)、Tomita, N et al., Biochem. Biophys. Res., 186, p129-134 (1992)、Tomota, N et al., Cric. Res., 73, p898-905 (1993)]、陽イオン性リポソーム (特表平2000-510151号公報、特表平2000-516630号公報)等が知られている。センダウイルス (HVJ) と融合させたHVJ-膜融合リポソームを用いることは、特に好ましい。リポソームの表面にHVJの糖タンパクを組み込み、又は共有結合させてポリエチレングリコール等を添加すると、細胞への遺伝子導入効率が上昇する。

HGFをコードするDNAにシグナル配列、プロモーター及びポリアデニル化配列を付加したDNAをリポソーム中に含有させることにより、また、HGFをコードするDNAを含む組換え発現ベクターをリポソーム中に含有させることに

より、本発明の喘息の予防・治療剤とすることができる。

#### 【0044】

マイクロカプセルはフィルムコートされた粒子であり、膜形成ポリマー誘導体、疎水性可塑剤、表面活性剤または／および潤滑剤窒素含有ポリマーの混合物からなるコーティング材料でコートされた粒子等で構成される。

HGFをコードするDNAにシグナル配列、プロモーター及びポリアデニル化配列を付加したDNAをマイクロカプセル中に含有させることにより、また、HGFをコードするDNAを有する組換え発現ベクターをマイクロカプセル中に含有させることにより、本発明の喘息の予防・治療剤とすることができる。

#### 【0045】

HGF又はその塩等を直接投与するか、又はHGFをコードするDNA等を投与し、HGFを投与部位において発現させることにより、投与された生体の気管支炎の炎症等を抑制することができる。それ故、(a) HGFもしくはその部分ペプチド又はそれらの塩、または(b) HGFもしくはその部分ペプチドをコードするDNAもしくはRNAは、喘息の予防・治療剤として使用することができる。

#### 【0046】

前記「喘息」とは、いわゆるアレルギー性の慢性気道炎症や気道過敏性亢進(AHR)等に関係する一連の症候群をいう。本発明の喘息の予防・治療剤は、急性・一過性又は慢性の喘息の両方において有効であり、小児喘息においてもその効果を発揮する。喘息の原因が、例えばウイルス感染(いわゆる風邪)、アレルギー、化学物質によるもの等のいかなる場合であっても、また特に小児喘息においては、アトピー型であろうと非アトピー型であろうと、これらの予防・治療に有効に使用することができる。

#### 【0047】

本発明の喘息の予防・治療剤がHGFからなる場合は、常套手段に従って製剤化することができる。一方、HGFをコードするDNA等を該予防・治療剤として使用する場合は、上述した通り、該DNA等を単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクターまたはアデノウイルス

スアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って製剤化することができる。本発明のDNA等は、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与することもできる。

#### 【0048】

例えば、HGF若しくはその塩又はHGFをコードするDNA等は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に投与したり、患部、皮下、筋肉内等に埋め込むこともできる。または水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に投与することもできる。

本発明の製剤は、例えば、HGF若しくはその塩又はHGFをコードするDNA等を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤又は徐放性を付与する物質等とともに混和することによって製造することができる。

#### 【0049】

錠剤、カプセル剤などにおいて混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤；結晶性セルロースのような賦形剤；コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤；ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤；ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤；ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが挙げられる。カプセル剤の場合には、さらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水性液または油性液に有効成分を溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート80<sup>TM</sup>、HCO-50）などを併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶

解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。さらに、前記無菌組成物には、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などが配合されてもよい。調製された無菌組成物は通常、適当なアンプルに充填され、注射剤として供される。

#### 【0050】

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）等に対して投与することができる。

#### 【0051】

本発明に用いられるHGFをコードするDNA等を製剤化せずに生体に投与する場合は、公知の方法に従って行ってよいが、例えば、DNAを直接体内に導入する*in vivo*法、又は投与されるヒト等からある種の細胞を体外に取り出して、これにDNAを導入し、その形質転換細胞を体内に戻す*ex vivo*法がある〔日経サイエンス、4月号、20-45（1994）、月間薬事、36、23-48（1994）、実験医学増刊、12、15（1994）〕。それぞれの方法において、DNAを細胞に導入する方法としては、上述したようにアデノ随伴ウイルス、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター等の組換え発現ベクターに含有させて、該発現ベクター等を導入する遺伝子導入方法、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム沈殿、遺伝子銃で担体（金属粒子等）とともにDNAを細胞内に導入する方法等、自体公知の方法により細胞に導入する方法〔Wu et al., J. Biol. Chem. 267, 963-967(1992)、Wu et al., J. Biol. Chem. 263, 14621-14624, (1988)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, 2726-2730 (1991)〕が挙げられる。またリポソーム等を用いる場合には、リポソーム法、HVJ-リポソーム法、陽イオン性リポソーム法、リポフェクチン法、リポフェクトアミン法等が挙げられる。

中でも、導入効率の観点から、アデノウイルスベクター又はレトロウイルスベクターを用いる遺伝子導入方法が望ましい。

#### 【0052】

また、上記組換え発現ベクターを宿主細胞に導入し、該形質転換体を本発明の予防・治療剤とすることもできる。その場合は、例えば形質転換体をカプセル等に含有させてカプセル製剤として生体に投与することができる。

またHVJ-リポソーム等のリポソームを用いる場合には、例えば、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤の形態とすることができる。

#### 【0053】

本発明にかかる喘息の予防・治療剤は、経口的に投与したり、患部、皮下、筋肉等に埋め込んだり、静脈投与することができるが、好ましくは静脈投与又は気管支に局所的に投与することが好ましい。

また本発明の喘息の予防・治療剤の投与時期は、喘息の症状が起こった時に投与されるのが好ましい。また喘息の慢性化、重症・難治化に繋がる危険性がある場合等には、継続的に投与され、気道の不完全修復（remodeling：リモデリング）を予防するのが好ましい。

#### 【0054】

本発明の予防・治療剤の投与量は、投与対象、症状、投与形態、処置期間等により異なるので一概には言えないが、通常、静脈投与の場合、HGFとして、約 $250 \sim 1000 \mu\text{g}/\text{Kg}/\text{日}$ 、好ましくは約 $300 \sim 800 \mu\text{g}/\text{Kg}/\text{日}$ 、特に好ましくは、約 $300 \sim 550 \mu\text{g}/\text{Kg}/\text{日}$ 、またHGFをコードするDNA等として、約 $0.2 \sim 40,000 \mu\text{g}/\text{Kg}/\text{日}$ 、好ましくは約 $2 \sim 2,000 \mu\text{g}/\text{Kg}/\text{日}$ である。

#### 【0055】

本発明の製剤を投与することにより、喘息の発作時における気道の炎症を抑制及び予防することができる。気道の炎症時には、通常「気管支平滑筋の収縮」「粘膜の浮腫」「分泌物の増加」等の変化が起こっていると考えられており、具体的な症状としては呼吸停止等が見られる。病理形態的には、肺組織への炎症細胞、例えば好酸球、Tリンパ球やマクロファージ等の浸潤、気道上皮組織における

粘液産生細胞（杯細胞）の過増殖等により確認できる。また、血清中の抗原特異的 I g E 値が上昇し、更には、気管支肺胞洗浄液（以降、BAL 液と略す場合がある）中の T h 2 サイトカイン、例えば I L - 4、I L - 5、I L - 1 3 等やグロースファクター、例えば血小板由来増殖因子（P D G F）、神経増殖因子（N G F）、変形増殖因子（T G F -  $\beta$ ）の濃度が上昇することが確認されている。

従って、本発明の製剤を投与すると、炎症時に見られる上記の現象が抑制される。

#### 【0056】

本発明の製剤の気道炎症抑制作用効果は、マウスを用いた抗原反復吸入暴露による実験的気管支喘息モデルを作成し、該マウスが気道の炎症反応を起こす環境下において本発明の製剤を該マウスに投与し、気道炎症及び気道過敏性亢進が抑制されることにより確認することができる。

気管支喘息モデルの作製は特に限定されないが、例えば、マウスに卵白アルブミン感作・吸入暴露を施して抗原特異的免疫性を付与する方法が挙げられる。この抗原誘発アレルギー性気道炎症モデルマウスに、例えばメサコリン（Methacholine）等の気道収縮作用を有する物質を吸入させることにより、気道炎症を引き起こさせることができる。

#### 【0057】

血清中抗原特異的 I g E 値の測定には、例えば E L I S A 法（Temann, U. A., Am. J. Respir. Cull. Mol. Biol., 16, p471-478, 1997）等を用いることができる。

BAL 液中の炎症細胞を含む全 BAL 細胞数の測定は、例えば生理食塩水で肺胞内を洗浄し、得られた BAL 液中に存在する細胞の数を顕微鏡下で計測することにより行うことができる。

BAL 液上清中の I L - 4、I L - 5、I L - 1 3 等のサイトカインや P D G F、N G F、T G F -  $\beta$  等のグロースファクターの濃度の測定は、例えば E L I S A 法により行うことができる。E L I S A における比色計測定は、それぞれ添付の使用説明書に記載の方法に従って行うのがよい。

#### 【0058】

組織学的及び免疫組織学的に気道炎症を確認する方法としては、例えば、肺胞の気管支周辺の肺組織を過ヨウ素酸シッフ染色後、顕微鏡下で粘液産生細胞（杯細胞）の数を計測する方法、また気管支周辺の組織細胞をヘマトキシリン-エオジン染色後、同じく顕微鏡下で好酸球、リンパ球又はマクロファージの数を計測する方法等が挙げられる。これらの計測には、NIH Image Analysis system(National Institute of Health, Bethesda, MD)等を用いることができる。また、気管支周辺組織細胞に、例えば抗TGF- $\beta$ ウサギIgGを吸着させ、その後アビジン-ビオチン処理 (Ueki, T., et al. Nat. Med., 5, p226-230, 1999) することにより、細胞内のTGF- $\beta$ の蓄積を確認することができる。

#### 【0059】

##### 【実施例】

以下に、実施例等を示して本発明を具体的に説明するが、言うまでもなく、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 【0060】

(製造例) HGFを含有する製剤の製造

##### (1) HGF cDNAの作製

ヒトのMRC-5線維芽細胞からFast Track mRNA isolation kit (Invitrogen)を使用し、mRNAを単離し、これを使用してRT-PCR (reverse transcription/polymerase chain reaction)を行い、HGF cDNAを単離した。具体的には、mRNA溶液0.5  $\mu$ l (150 ng)、10 $\times$ RT-PCR溶液 [500 mM KCl、100 mM トリス-HCl (pH 9.0)、1% Triton X-100、15 mM MgCl<sub>2</sub>] 5  $\mu$ l、dNTP (2.5 mM) 4  $\mu$ l、プライマー：1 (10 mM) 2  $\mu$ l、プライマー：2 (10 mM) 2  $\mu$ l、Taqポリメラーゼ (Takara) 0.5  $\mu$ l、RNasin (Promega) 0.5  $\mu$ l、逆転写酵素 (Takara) 0.5  $\mu$ l 及びDEPC処理H<sub>2</sub>O 35.2  $\mu$ lを混合し、42 $^{\circ}$ C 30分、95 $^{\circ}$ C 5分で逆転写反応を行い、94 $^{\circ}$ C 30秒、55 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 1分のサイクルを40回繰り返し、さらに72 $^{\circ}$ C 7分間反応させHGF cDNAを得た。このようにして得られたHGF cDNAをTA Cloning Kit (Invitrogen)を使用してpCRII<sup>TM</sup>ベクターにクローニング

し、pCRII/HGFを得た。

なお、プライマー：a及びプライマー：bの配列は、以下の通りのとおりである。

プライマー：a；5' - CCCGTCCAGCGGTACCATGTGGGTGACC - 3' (配列番号5)

プライマー：b；5' - TACGGGATGGACTAGTTAGACTATTGTAG - 3' (配列番号6)

## (2) 組換え発現ベクターの構築

(1) で作製したpCRIIベクターに組み込まれたHGF cDNAを制限酵素 Kpn I / Spe Iで切断し、T4 DNAポリメラーゼ(Takara)処理により切断末端を平滑化させた。得られたHGF cDNA断片をあらかじめ制限酵素 Xho Iで処理した後、切断末端を平滑化しておいたCHO細胞用発現ベクターpCAGGS-DHFRと混合し、T4 DNAリガーゼで結合してHGF発現ベクターpCAGGS-DHFR/HGFを得た。得られたHGF発現ベクターはニワトリβ-アクチンプロモーターとウサギβ-グロビンポリ(A)シグナル配列の間にHGF cDNAを有する。また、形質転換された細胞の選択は、マウスジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子にサイトメガロウイルス初期プロモーターとポリ(A)シグナル配列で連結したDHFRキメラ遺伝子により可能となる。

### 【0061】

## (3) チャイニーズハムスターCHO細胞への形質転換とその発現

上記CHO細胞発現用ベクターpCAGGS-DHFR/HGFはWiglerらの方法[Cell, 11, p233 (1977)]によりチャイニーズハムスターCHO細胞のDHFR欠損細胞に導入した。約30μgのpCAGGS-DHFR/HGFプラスミドをそれぞれ240μlの0.5M塩化カルシウムに溶解し、20mM HEPES、280mM塩化ナトリウム及び1.5mMリン酸ナトリウムからなる2×HEPES緩衝液(pH7.1)240μlを攪拌しながら加えた。室温で30分攪拌を続けプラスミドとリン酸カルシウムの共沈殿物を形成させた。続いて、10%ウシ胎仔血清(ギブコ社)と1%グルタミンとを含むα-MEM培地(フローラボラトリー社)を用いて5×10<sup>5</sup>個のCHO細胞を5%CO<sub>2</sub>存在下で37℃、24時間培養した。培地交換した後、プラスミドとリン



酸カルシウム共沈殿物を加え室温で20分間放置した。さらに、37℃で4時間インキュベートした後、培地を除去し、15%グリセリンを添加した1×HEPES緩衝液を加え室温で5分間放置した。培地で細胞を洗浄した後、培地交換しさらに37℃で7日間培養して形質転換細胞を得た。得られた細胞株はリボヌクレオシドとデオキシリボヌクレオシドを含まず、透析した10%ウシ胎仔血清（ギブコ社）、2%グルタミンを含む $\alpha$ -MEM培地（フローラボラトリー社）を用いて安定なHGF高生産株を得るために100 nM、250 nM、500 nM、750 nM、1  $\mu$ M、2  $\mu$ Mとメソトレキセート濃度を順次追加させながら同培地で継代培養を繰り返した。得られたHGF産生組換え細胞をクローン選別を行い、安定なHGF生産株を得た。

#### 【0062】

##### (4) 形質転換CHO細胞培養上清からの組換えHGFの精製

上記実施例9で得られたHGF産生チャイニーズハムスターCHO組換え細胞株をリボヌクレオシドとデオキシリボヌクレオシドを含まず、10%ウシ胎仔血清（ギブコ社）と1%グルタミンと2  $\mu$ M メソトレキセートを含む $\alpha$ -MEM培地（フローラボラトリー社）で培養し、その培養上清より、組換えHGFを精製した。

##### イ) ヘパリンアフィニティークロマトグラフィー

HGF産生チャイニーズハムスターCHO組換え細胞株の培養液12Lに最終濃度0.01%になるようにTween 80を添加し、ステベックスHVフィルター（日本ミリポア）により濾過した。0.15M 塩化ナトリウムを含む緩衝液A（20mM Citrate-NaOH、0.01% Tween 80、pH 6.5）で平衡化したヘパリンセファロースCL-6B（ファルマシア製、カラム体積 50ml）に添加した。0.5M 塩化ナトリウムを含む緩衝液Aで洗浄後、0.5Mから2.5Mの塩化ナトリウムによる直線濃度勾配により溶出したピーク画分を集め、ヘパリン溶出液Aとした。

##### ロ) 陰イオン交換クロマトグラフィー

ヘパリン溶出液Aを100倍容の緩衝液B（20mM Tris-HCl、0.01% Tween 80、pH 8.0）で3回透析を行った後、緩衝液Bで平

平衡化したDEAE-セファロース（ファルマシア製、カラム体積 40 ml）に添加した。緩衝液Bで洗浄後、1 M 塩化ナトリウムを含む緩衝液Bで溶出したピーク画分を集め、DEAE溶出液とした。

#### ハ) ヘパリンアフィニティークロマトグラフィー（2回目）

DEAE溶出液を100倍容の緩衝液Aで3回透析を行った後、0.15 M 塩化ナトリウムを含む緩衝液Aで平衡化したヘパリン-セファロースCL-6B（ファルマシア製、カラム体積 50 ml）に添加した。0.3 M 塩化ナトリウムを含む緩衝液Aで洗浄後、0.3 Mから2.5 Mの塩化ナトリウムによる直線濃度勾配により吸着物を溶出した。HGFのピーク画分を集め、ヘパリン溶出液Bとした。精製された組換えHGFの収量は約12 mgであり、培養上清液からの回収率は約50%であった。

#### ニ) SDS-ポリアクリルアミド電気泳動

組換えHGFを2-メルカプトエタノール還元下及び非還元下でSDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行った。精製組換えHGFは非還元条件下[2-ME (-)]では約50 kDaを示し、還元条件下[2-ME (+)]では約67 kDaを示した。

#### (5) 凍結乾燥剤の作製

生理食塩水100 ml中に(4)で調整した組換えHGF(1 g)、マンニトール(1 g)及びポリソルベート80(10 mg)を含有する溶液を無菌的に調整し、1 mlずつバイアルに分注した後、凍結乾燥して密封して、本発明の製剤を凍結乾燥剤として調整した(製剤1)。

#### 【0063】

(実施例) HGF投与による気道炎症抑制効果の確認

##### (1) 気道過敏性亢進におけるHGF投与の影響

雌の8~10週令マウス(BALB/c: Charles River Japan, Inc.)に卵白アルブミン(OVA)非含有飼料を与え、一定温度、一定光サイクル下で飼育した。

気管支喘息モデルマウスを、以下に示す方法により作製した。

生理食塩水100  $\mu$ l中に20  $\mu$ g OVA (Grade V, Sigma, St. Louis MO) 及

び 2. 25 mg 硫酸アルミニウム (乳化剤: AlumImject; Pierce, Rockford, IL) を懸濁し、この懸濁液をマウスの腹腔内に、飼育開始 0 日後及び 14 日後に投与した。該マウスに、生理食塩水にて 1 % の OVA を含む液を、超音波ネブライザーを用いて、20 分間、OVA を吸入させた。吸入暴露は、飼育開始 28、29 及び 30 日後に行った。

気管支喘息モデルマウス作製中に、一部のマウスに製造例で得た製剤 1 を投与した。1 mg の製剤 1 を 10 ml の生理食塩水に溶解・希釈後、該溶液 0.2 ml を飼育開始後 27 ~ 31 日の期間毎日、継続的に皮下投与した (HGF 投与群、n = 16 : 感作 / 暴露 + HGF)。製剤 1 の投与量は、HGF として 500  $\mu$ g / kg / 日とした。

製剤 1 を生理食塩水に溶解して作成した溶液に代えて、生理食塩水 0.2 ml を、飼育開始後 27 ~ 31 日に継続的に皮下投与した群も作製した (生理食塩水投与群、n = 16 : 感作 / 暴露 + 生理食塩水)。また、上記の OVA による感作・暴露を行わないマウスを、対照群 (n = 16 : 非感作 / 非暴露) とした。

尚、群間比較は、二元配置分散分析を行った後、生理食塩水投与群と HGF 投与群との間 (\*)、又は対照群と生理食塩水投与群との間 (#) で、差を検定することにより行った (t 検定)。以降の試験においても、同様に群間比較を行った。

#### 【0064】

気管支喘息モデルマウスにおける気道過敏性の評価は、以下に示す方法により行った。メサコリン含有生理食塩水 (3.125 ~ 25 mg / ml) 又は生理食塩水のみを超音波ネブライザー (NE-U07, OMRON 社製) にて、気管支喘息モデルマウスの HGF 投与群、生理食塩水投与群及び気管支喘息でない対照群にそれぞれ 3 分間吸入させた後、ホールボディープレチスモグラフィボックス内にマウスを入れ、マウスが覚醒下かつ無拘束の状態、バロメトリックプレチスモグラフィ (Barometric plethysmography: Buxco Electronics Inc, Troy, NY) によるコンピュータ呼吸機能解析システム (Buxco Electronics Inc., Troy, NY) を用いて気道過敏性 (Penh) を測定した。Penh の測定は以下の式に従った。

$$Penh = PEP / PIP \times Te - Tr / Tr$$

PEP; peak expiratory pressure (ml/s), maximal positive box pressure occurring in one breath

PIP; peak inspiratory pressure (ml/s), maximal negative box pressure occurring in one breath

Te; expiratory time (s), time from end of inspiration to start of next inspiration

Tr; relaxation time (s), time of the pressure decay to 36% of total box pressure during expirations

Cieslewicz. G et al., JCI, 104, p301-308 (1999)

その結果、各群において、生理食塩水のみを吸入した時に得られるベースラインPenh値には殆ど差がなかった（非感作／非暴露： $0.49 \pm 0.04$ 、感作／暴露＋生理食塩水： $0.53 \pm 0.17$ 、感作／暴露＋HGF： $0.53 \pm 0.13$ ）が、メサコリンを吸入した場合、生理食塩水投与群ではメサコリン濃度に依存して急激な気道過敏性の上昇が見られた。これに対しHGF投与群では、その気道過敏性の上昇が有意に抑制された（図1）。

#### 【0065】

##### (2) BAL液中炎症細胞数の測定

(1)に記載の試験48時間後、各群のマウスの気管支・肺胞内を、気管内チューブを介して生理食塩水（1ml、37℃）で2回洗浄した。洗浄液を回収し、全BAL液量及びBAL液内の全細胞数を、Burker-turk式血球計算板を用いて測定した。次いで、BAL液からサイトスピン（Cytospin3：SHANDON社製）を用いて単層標本作製し（4,000rpm、5分）、これをメイ・ギムザ染色（13分）した。該組織単層標本を顕微鏡下において観察し、BAL液中におけるマクロファージ、リンパ球、好中球、好酸球等の炎症細胞数を測定した。

その結果、対照群においては、全BAL細胞数が少なく、またその内約95%以上をマクロファージが占めており、他の炎症細胞は殆ど見られなかった。生理食塩水投与群においては、著しいリンパ球と好酸球の増加が見られた。これに対し、HGF投与群では、生理食塩水投与群において見られたリンパ球と好酸球数の増加が有意に抑制されていた（図2）。

## 【0066】

## (3) 気管支周囲・血管周囲の組織内における浸潤炎症細胞数の測定

(2) の肺胞内洗浄後の右肺に 2 ml の空気を、気管内チューブを介して送り、右肺胞を膨らませ、10%ホルマリンで、48時間固定した。この固定組織から主気管支周辺の肺組織ブロックを切り出し、パラフィン固定した。ブロックから 4  $\mu$ m 厚の組織切片を作製し、これらを顕微鏡スライド上に固定した後パラフィンを除去した。該組織検体スライドをヘマトキシーン-エオジン染色し、明視化された炎症細胞の浸潤状況を顕微鏡下で観察した（最終倍率 $\times 400$ 、インセット $\times 1,000$ ）。炎症細胞数の計測には、NIH Image Analysis system (National Institute of Health, Bethesda, MD)等を用いた。上記計測は、ランダムに選択した 10 視野に対して行い、組織 1 mm<sup>2</sup>当たりの細胞数の平均値を算出した。また試験に供した各群のマウスの数はそれぞれ 16 匹とした。

ヘマトキシーン-エオジン染色は以下の通り行った。組織検体スライドを脱パラフィン後、ヘマトキシリン液による染色を室温で 5 分間行い、37℃のぬるま湯に 5 分間浸漬することにより余分な色素を洗い流した。次いで、検体を室温で 95%アルコールに 15 秒浸し、親和させた後、水溶性エオジン液により対比染色を 10 分間行った。

その結果を図 3 及び図 4 に示す。対照群（図 3-(a)、図 4）においては、殆ど気管支周囲・血管周囲組織に炎症細胞の浸潤は見られなかったが、生理食塩水投与群においては、炎症細胞の浸潤が見られ、その細胞数が著しく増加した（図 3-(b)、図 4）。これに対し、HGF 投与群では、生理食塩水投与群に比較して、炎症細胞の浸潤の程度が低く、その細胞数の増加が抑制されていた（図 3-(c)、図 4）。

## 【0067】

## (4) 気道上皮組織における粘液産生細胞（杯細胞）数の測定

(3) の右肺固定組織から気道上皮組織を含む主気管支周辺の肺組織ブロックを切り出し、組織検体スライドを作製した。該組織検体スライドを過ヨウ素酸シッフ染色し、明視化された杯細胞の数を顕微鏡下で計測した（最終倍率 $\times 1,000$ ）。計測には、NIH Image Analysis system (National Institute of Health)

h, Bethesda, MD)等を用いた。上記計測をランダムに選択した10視野に対して行い、気道上皮基底膜の単位長さ(1mm)当りの細胞数の平均値を算出した。

また、細胞中の粘液含有量を、過ヨウ素酸シッフ染色により着色される色の濃さ(染色率)から判定し、粘液産生細胞を染色率が50%以上又は50%以下の2種類に分類した。

過ヨウ素酸シッフ染色以下の通り行った。組織検体スライドを脱パラフィン後、検体を室温で1%過ヨウ素酸水溶液に浸漬し、酸化させた。流水で水洗後、検体をシッフ試薬により室温で10分間染色し、再び流水で十分水洗後、ヘマトキシリン液により1分間の核染色を行った。

結果を図5に示す。生理食塩水投与群においては、対照群(図5-(a)、(d))に比べて粘液産生細胞の数が顕著に増加した(図5-(b)、(d))。これに対し、HGF投与群では、粘液産生細胞数の増加が抑制されており(図5-(c)、(d))、しかも粘液含有量50%以上の細胞の数(図5-(e))も、生理食塩水投与群に比べて顕著に低く(生理食塩水投与群:  $165 \pm 27$  個/mm、HGF投与群:  $54 \pm 16$  個/mm)、各細胞内における粘液の分泌量も低下していることが確認された。

#### 【0068】

##### (5) BAL液中サイトカイン及びグロースファクターの濃度測定

BAL液中のサイトカイン及びグロースファクターの濃度は、BAL液を遠心(4℃、3,000rpm、10分間)して得られた上清を用いて測定した。IL-4、IL-5、IL-12、IL-13並びにPDGFは、R&D (Minneapolis, MN)のELISAキットを、またTGF- $\beta$ 又はNGFはそれぞれPromege (Madison, WI)又はChemicon (Temecula, CA)のELISAキットを用いて、それぞれ添付の使用説明書に記載の方法に従って測定した。

結果を図6及び図7に示す。生理食塩水投与群においては、IL-4、IL-5並びにIL-13のサイトカイン(図6-(a)、(b)並びに(d))、及びPDGF、NGF、TGF- $\beta$ (図7-(a)、(b)、(c))のいずれも、対照群に比べて顕著に濃度が上昇した。これに対し、HGF投与群では、これらの濃度の上昇が全て有意に抑制された。一方IL-12濃度は、対照群に比

べ、生理食塩水投与群では低下したが、HGF投与群では有意に上昇した（図6 - (d)）。

#### 【0069】

##### (6) 肺組織中におけるTGF- $\beta$ の蓄積

(2) の肺胞洗浄後の左肺を70%エタノールで12時間脱水した。脱水した左肺をパラフィン固定後、(3)と同様に組織検体スライドを作製した。組織検体に抗TGF- $\beta$ ウサギIgG (Promega, Madison, WI) を吸着させ(1:250)、次いで、アビジン-ビオチン免疫染色を施し、組織内のTGF- $\beta$ を明視化し、顕微鏡下（最終倍率 $\times 1,000$ ）で観察した。

抗TGF- $\beta$ ウサギIgGの吸着は、4℃、12時間で行い、アビジン-ビオチン処理は、室温で60分間行った。パーオキシダーゼ標識ポリマー試薬の反応は遮光下で、室温、15分間行った。

その結果、生理食塩水投与群（図8-b）においては、対照群（図8-a）に比べて気道上皮及び炎症細胞の殆どが染色され、細胞内においてTGF- $\beta$ が産生されていることが確認された。これに対し、HGF投与群（図8-c）では、染色された細胞の数が生理食塩水投与群に比べて少なく、TGF- $\beta$ の産生が抑制されていることが確認された。

#### 【0070】

##### (7) 血清中抗原特異的IgE抗体（抗OVAIgE）量の測定

各群のマウスの下大静脈より、血液サンプルを採取し、4℃、1,500rpmで20分遠心し、血清サンプルを作製した。

96ウエルのプレート（NUNC IMMUNOPLATE I: Nunc）に、5 $\mu$ g/mlのモノクロナル抗マウスIgE抗体（Serotec）を含むPBS希釈液を100 $\mu$ l/wellで分注し、4℃にて1晩反応させてプレートをコートした。その後、各ウエルを0.1%Tween20-PBS（-）（Ca<sup>2+</sup>及びMg<sup>2+</sup>を含まない）（洗浄用バッファー）にて5回洗浄し、1%BSA（和光純薬工業株式会社）-PBSを150 $\mu$ l/wellで加え、室温にて1時間インキュベートした。ついで、洗浄用バッファーにて5回洗浄し、各群のマウスの血清サンプルを100 $\mu$ l/wellずつ加え、室温にて1時間インキ

キュベートした。同時に、標準曲線作成用として、あらかじめ総 IgE 抗体量測定  
の系で定量したモノクロナル抗OVA特異的 IgE 抗体を、1% BSA-0.1  
% Tween 20-PBS (希釈バッファー) で各種濃度に希釈して、同一プ  
レートの別のウェルに加えた。各ウェルを洗浄バッファーで5回洗浄した後、希  
釈バッファーで50倍に希釈したビオチン標識OVAを100  $\mu$ l/wellで  
加え、さらに室温で1時間インキュベートした。各ウェルを、洗浄バッファーで  
5回洗浄し、希釈バッファーで3000倍に希釈したパーオキシダーゼ結合スト  
レプトアビジン (peroxidase conjugated strepta  
vidin DAKO) を100  $\mu$ l/wellで加え、さらに室温で1時間イン  
キュベートした。各ウェルを、洗浄バッファーで5回洗浄し、基質溶液 (0.1  
M クエン酸、0.2M NaHPO<sub>4</sub>、O-フェニレンジアミン、および30%  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含む) を100  $\mu$ l/wellで加えて、室温暗所にて約30分間反応  
させた後、プレートの各ウェルの吸光度を492nmで測定した。

結果を図9に示す。生理食塩水投与群においては、抗OVA特異的 IgE の濃  
度が、対照群に比べて著しく上昇した。これに対し、HGF投与群では、抗OV  
A特異的 IgE の濃度の上昇が抑制された。

#### 【0071】

##### 【発明の効果】

本発明の喘息の予防・治療剤は、気道の炎症時に確認される炎症細胞の気道粘  
膜細胞内への流入、Th2サイトカイン及びグロースファクター等の気道組織内  
での濃度上昇等を抑制し、気管支喘息における炎症反応を極めて有効に抑制する  
ことができ、慢性喘息或いは重症・難治性喘息への移行を予防することができる  
。しかも、その有効成分を生体由来のHGF又はそのHGFをコードするDNA  
とすることから、生体に投与しても、従来のステロイド吸入において見られる様  
な副作用がない。従って本発明の喘息の予防・治療剤は、生体に非常に安全であ  
る。

##### 【配列表】

<110> クリングルファーマ株式会社



<110> 中村 敏一

<120> 喘息の予防・治療剤

<130> DK12J937

<160> 6

<210> 1

<211> 728

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val			
1	5	10	15
Leu Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu			
	20	25	30
Gly Gln Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser			
	35	40	45
Ala Lys Thr Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys			
	50	55	60
Thr Lys Lys Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr			
	65	70	75
Arg Asn Lys Gly Leu Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp			
	80	85	90
Lys Ala Arg Lys Gln Cys Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser			
	95	100	105
Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu			
	110	115	120

Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser		
125	130	135
Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln		
140	145	150
Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His Ser Phe Leu Pro Ser		
155	160	165
Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro		
170	175	180
Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu		
185	190	195
Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu		
200	205	210
Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His		
215	220	225
Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro		
230	235	240
His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe		
245	250	255
Asp Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp		
260	265	270
Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile		
275	280	285
Lys Thr Cys Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu		
290	295	300
Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly		
305	310	315
Thr Val Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp		
320	325	330
Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys		

335	340	345
Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser		
350	355	360
Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly		
365	370	375
Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln Asp		
380	385	390
Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Gln		
395	400	405
Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu		
410	415	420
Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu		
425	430	435
Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro		
440	445	450
Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro		
455	460	465
Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu		
470	475	480
Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val		
485	490	495
Val Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser		
500	505	510
Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys		
515	520	525
Glu Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp		
530	535	540
Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly		
545	550	555

Arg Gly Asp Glu Lys Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu		
560	565	570
Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala		
575	580	585
Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro		
590	595	600
Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr		
605	610	615
Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu Arg		
620	625	630
Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His		
635	640	645
His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly		
650	655	660
Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly		
665	670	675
Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val		
685	685	690
Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly Ile		
695	700	705
Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile		
710	715	720
Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser		
725	728	

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 723

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val			
1	5	10	15
Leu Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu			
	20	25	30
Gly Gln Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser			
	35	40	45
Ala Lys Thr Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys			
	50	55	60
Thr Lys Lys Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr			
	65	70	75
Arg Asn Lys Gly Leu Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp			
	80	85	90
Lys Ala Arg Lys Gln Cys Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser			
	95	100	105
Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu			
	110	115	120
Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser			
	125	130	135
Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln			
	140	145	150
Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His Ser Tyr Arg Gly Lys			
	155	160	165
Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly			
	170	175	180
Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val			
	185	190	195
Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu Cys Met Thr Cys Asn			
	200	205	210

Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly Lys		
215	220	225
Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro His Arg His Lys Phe		
230	235	240
Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys		
245	250	255
Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr Thr Leu Asp		
260	265	270
Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys Ala Asp		
275	280	285
Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu Cys		
290	295	300
Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile		
305	310	315
Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His		
320	325	330
Glu His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg		
335	340	345
Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys		
350	355	360
Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile		
365	370	375
Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn		
380	385	390
Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu		
395	400	405
Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His		
410	415	420
Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys		

425	430	435
Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly		
440	445	450
Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu		
455	460	465
Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu Asp His Pro Val Ile		
470	475	480
Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro		
485	490	495
Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg Tyr Arg Asn		
500	505	510
Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu		
515	520	525
Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Glu		
530	535	540
Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys		
545	550	555
Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu		
560	565	570
Gly Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu		
575	580	585
Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr		
590	595	600
Ile Pro Glu Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr		
605	610	615
Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr		
620	625	630
Ile Met Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val		
635	640	645

Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly  
 650 655 660  
 Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu  
 665 670 675  
 Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val Ile Val Pro Gly Arg  
 685 685 690  
 Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val Ala  
 695 700 705  
 Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile Leu Thr Tyr Lys Val  
 710 715 720  
 Pro Gln Ser  
 723

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 2187

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct 50  
 gcatctcctc ctgctcccca tcgccatccc ctatgcagag ggacaaagga 100  
 aaagaagaaa tacaattcat gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta 150  
 atcaaaatag atccagcact gaagataaaa accaaaaaag tgaatactgc 200  
 agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt ccattcactt 250  
 gcaaggcttt tgtttttgat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc 300  
 ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaaa gaatttggcc atgaatttga 350  
 cctctatgaa aacaaagact acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac 400  
 gcagctacaa gggaacagta tctatcacta agagtggcat caaatgtcag 450  
 ccctggagtt ccatgatacc acacgaacac agctttttgc cttcgagcta 500  
 tcggggtaaa gacctacagg aaaactactg tcgaaatcct cgaggggaag 550



aagggggacc ctggtgtttc acaagcaatc cagaggtagc ctacgaagtc 600  
tgtgacattc ctcagtgttc agaagttgaa tgcattgacct gcaatgggga 650  
gagttatcga ggtctcatgg atcatacaga atcaggcaag atttgtcagc 700  
gctgggatca tcagacacca caccggcaca aattcttgcc tgaaagatat 750  
cccgacaagg gctttgatga taattattgc cgcaatcccg atggccagcc 800  
gaggccatgg tgctatactc ttgaccctca caccgctgg gactactgtg 850  
caattaaaac atgcgctgac aatactatga atgacactga ttttcctttg 900  
gaaacaactg aatgcatcca aggtcaagga gaaggctaca ggggcactgt 950  
caataccatt tggaatggaa ttccatgtca gcgttgggat tctcagtatc 1000  
ctcacgagca tgacatgact cctgaaaatt tcaagtcaa ggacctacga 1050  
gaaaattact gccgaaatcc agatgggtct gaatcaccct ggtgttttac 1100  
cactgatcca aacatccgag ttggctactg ctcccaaatt ccaaactgtg 1150  
atatgtcaca tggacaagat tgttatcgtg ggaatggcaa aaattatatg 1200  
ggcaacttat ccaaacaag atctggacta acatgttcaa tgtgggacaa 1250  
gaacatggaa gacttacatc gtcatacttt ctgggaacca gatgcaagta 1300  
agctgaatga gaattactgc cgaaatccag atgatgatgc tcatggaccc 1350  
tggtgctaca cgggaaatcc actcattcct tgggattatt gccctatttc 1400  
tcgttgtgaa ggtgatacca cacctacaat agtcaattta gaccatcccg 1450  
taatatcttg tgccaaaacg aaacaattgc gagttgtaaa tgggattcca 1500  
acacgaacaa acataggatg gatggttagt ttgagataca gaaataaaca 1550  
tatctgcgga ggatcattga taaaggagag ttgggttctt actgcacgac 1600  
agtgtttccc ttctcgagac ttgaaagatt atgaagcttg gcttgggaatt 1650  
catgatgtcc acggaagagg agatgagaaa tgcaaacagg ttctcaatgt 1700  
ttcccagctg gtatatggcc ctgaaggatc agatctggtt ttaatgaagc 1750  
ttgccaggcc tgctgtcctg gatgattttg ttagtacgat tgatttacct 1800  
aattatggat gcacaattcc tgaaaagacc agttgcagtg tttatggctg 1850  
gggctacact ggattgatca actatgatgg cctattacga gtggcacatc 1900  
tctatataat gggaaatgag aaatgcagcc agcatcatcg agggaaggtg 1950  
actctgaatg agtctgaaat atgtgctggg gctgaaaaga ttggatcagg 2000

accatgtgag ggggattatg gtggcccact tgtttgtgag caacataaaa 2050  
tgagaatggg tcttggtgtc attgttcctg gtcgtggatg tgccattcca 2100  
aatcgtcctg gtatttttgt ccgagtagca tattatgcaa aatggataca 2150  
caaaattatt ttaacatata aggtaccaca gtcatag 2187

<210> 4

<211> 2172

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct 50  
gcctctcctc ctgctcccca tcgcatccc ctatgcagag ggacaaagga 100  
aaagaagaaa tacaattcat gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta 150  
atcaaaatag atccagcact gaagataaaa accaaaaaag tgaatactgc 200  
agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt ccattcactt 250  
gcaaggcttt tgtttttgat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc 300  
ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaaa gaatttggcc atgaatttga 350  
cctctatgaa aacaaagact acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac 400  
gcagctacaa gggaacagta tctatcacta agagtggcat caaatgtcag 450  
ccctggagtt ccatgatacc acacgaacac agctatcggg gtaaagacct 500  
acaggaaaac tactgtcgaa atcctcgagg ggaagaaggg ggaccctggt 550  
gtttcacaag caatccagag gtacgctacg aagtctgtga cattcctcag 600  
tgttcagaag ttgaatgcat gacctgcaat ggggagagtt atcgaggtct 650  
catggatcat acagaatcag gcaagatttg tcagcgctgg gatcatcaga 700  
caccacaccg gcacaaattc ttgcctgaaa gatatcccga caagggtttt 750  
gatgataatt attgccgcaa tccgatggc cagccgaggc catggtgcta 800  
tactcttgac cctcacacce gctgggagta ctgtgcaatt aaaacatgcg 850  
ctgacaatac tatgaatgac actgatgttc ctttggaac aactgaatgc 900  
atccaaggtc aaggagaagg ctacaggggc actgtcaata ccatttggaa 950

tggaattcca tgtcagcgtt gggattctca gtatcctcac gagcatgaca 1000  
tgactcctga aaatttcaag tgcaaggacc tacgagaaaa ttactgccga 1050  
aatccagatg ggtctgaatc accctgggtgt tttaccactg atccaaacat 1100  
ccgagttggc tactgctccc aaattccaaa ctgtgatatg tcacatggac 1150  
aagattgtta tcgtgggaat ggcaaaaatt atatgggcaa cttatcccaa 1200  
acaagatctg gactaacatg ttcaatgtgg gacaagaaca tggaagactt 1250  
acatcgtcat atcttctggg aaccagatgc aagtaagctg aatgagaatt 1300  
actgccgaaa tccagatgat gatgctcatg gaccctgggtg ctacacggga 1350  
aatccactca ttccttggga ttattgcctt atttctcgtt gtgaaggtga 1400  
taccacacct acaatagtca atttagacca tcccgtata tcttgtgcca 1450  
aaacgaaaca attgcgagtt gtaaattggga ttccaacacg aacaaacata 1500  
ggatggatgg ttagtttgag atacagaaat aaacatatct gcggaggatc 1550  
attgataaag gagagttggg ttcttactgc acgacagtgt ttcccttctc 1600  
gagacttgaa agattatgaa gcttggcttg gaattcatga tgtccacgga 1650  
agaggagatg agaaatgcaa acaggttctc aatgtttccc agctgggtata 1700  
tggccctgaa ggatcagatc tggttttaat gaagcttgcc aggcctgctg 1750  
tcctggatga ttttgttagt acgattgatt tacctaatta tggatgcaca 1800  
attcctgaaa agaccagttg cagtgtttat ggctggggct acactggatt 1850  
gatcaactat gatggcctat tacgagtggc acatctctat ataatgggaa 1900  
atgagaaatg cagccagcat catcgaggga aggtgactct gaatgagtct 1950  
gaaatatgtg ctggggctga aaagattgga tcaggacat gtgaggggga 2000  
ttatggtggc ccacttgttt gtgagcaaca taaaatgaga atggttcttg 2050  
gtgtcattgt tcctggctgt ggatgtgcca ttccaaatcg tcctggtatt 2100  
tttgtccgag tagcatatta tgcaaaatgg atacacaaaa ttattttaac 2150  
atataaggta ccacagtcag ag 2172

<210> 5

<211> 28

<212> Artificial sequence

<213>

<400> 5

cccgtccagc ggtaccatgt gggtgacc

28

<210> 6

<211> 29

<212> Artificial sequence

<213>

<400> 6

tacgggatgg actagttaga ctattgtag

29

【図面の簡単な説明】

【図 1】 気管支喘息モデルマウスにおいて、メサコリン吸入による気道過敏性亢進に対する H G F 投与の影響を示した図である。

【図 2】 抗原の吸入暴露 48 時間後の気管支喘息モデルマウスにおいて、BAL 液中炎症細胞数の増加に対する H G F 投与の影響を示した図である。

【図 3】 抗原吸入暴露 48 時間後の気管支喘息モデルマウスにおいて、気管支周囲・血管周囲の組織内における浸潤炎症細胞数の増加に対する H G F 投与の影響を、組織学的に観察した組織標本写真を示す図である。(a) 対照群 (非感作／非暴露)、(b) 生理食塩水投与群 (感作／暴露＋生理食塩水)、(c) H G F 投与群 (感作／暴露＋H G F)

【図 4】 抗原吸入暴露 48 時間後の気管支喘息モデルマウスにおいて、気管支周囲・血管周囲の組織内における (a) 浸潤総炎症細胞数及び (b) 好酸球数の増加に対する H G F 投与の影響を示した図である。

【図 5】 抗原吸入暴露 48 時間後の気管支喘息モデルマウスにおいて、気道上皮の粘液産生細胞 (杯細胞) 数の増加に対する H G F 投与の影響を、組織学的に観察した組織標本写真を示す図 [(a) 対照群 (非感作／非暴露)、(b) 生理食塩水投与群 (感作／暴露＋生理食塩水)、(c) H G F 投与群 (感作／暴露＋H G F)] 及び (d) 各群における粘液産生細胞数並びに (e) 各群における

粘液含有量 50%以上の細胞の数で示した図である。

【図6】 抗原吸入暴露 48時間後の気管支喘息モデルマウスにおいて、BAL液中のサイトカイン〔(a) IL-4、(b) IL-5、(c) IL-13〕の濃度の増加及び(d) IL-12の低下に対するHGF投与の影響を示した図である。

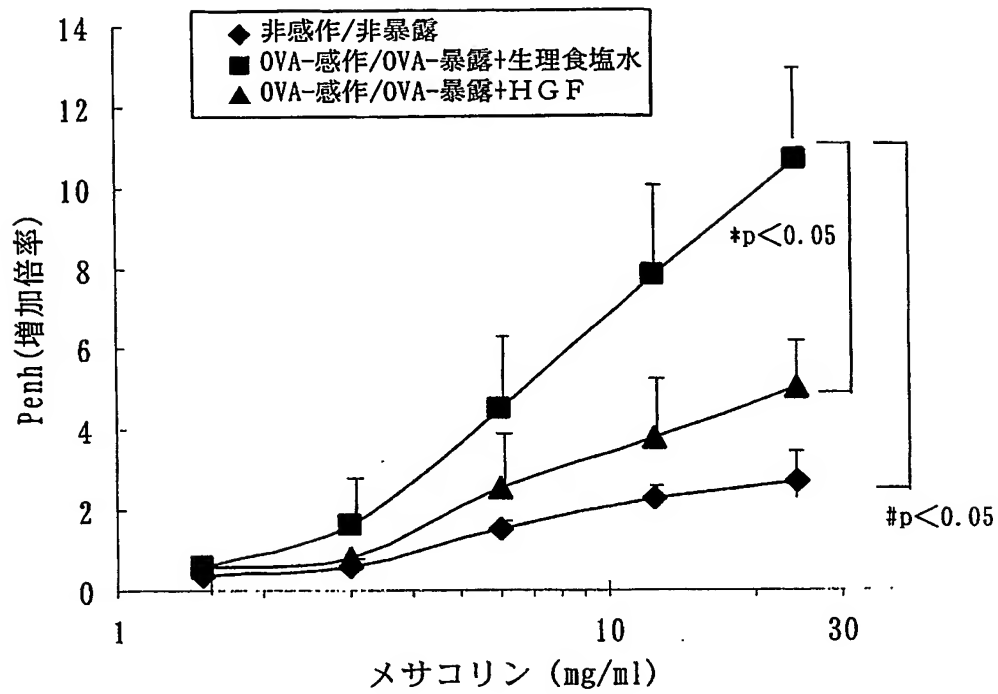
【図7】 抗原吸入暴露 48時間後の気管支喘息モデルマウスにおいて、BAL液中のグロースファクター〔(a) PDGF、(b) NGF並びに(c) TGF- $\beta$ 〕の濃度の上昇に対するHGF投与の影響を示した図である。

【図8】 抗原吸入暴露 48時間後の気管支喘息モデルマウスにおいて、肺組織中におけるTGF- $\beta$ の蓄積に対するHGF投与の影響を、組織学的に観察した組織標本写真を示す図である。(a) 対照群(非感作/非暴露)、(b) 生理食塩水投与群(感作/暴露+生理食塩水)、(c) HGF投与群(感作/暴露+HGF)

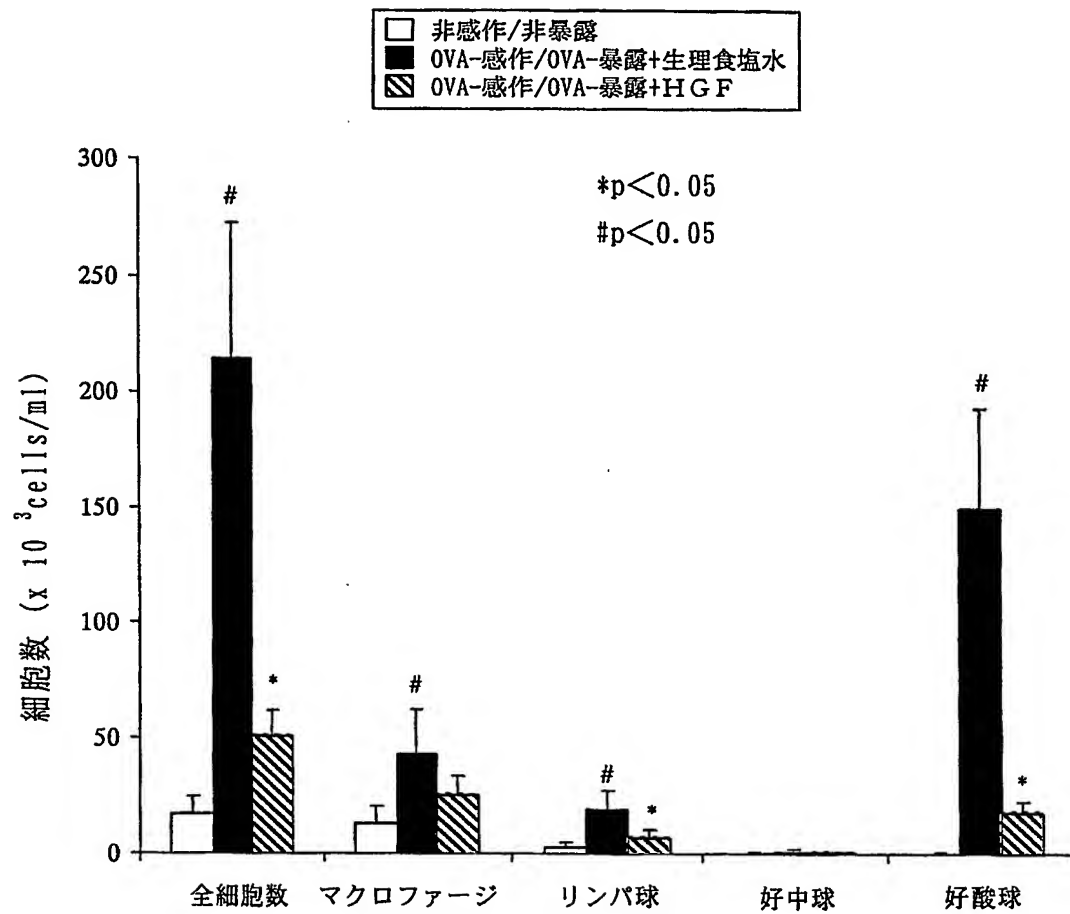
【図9】 抗原吸入暴露 48時間後の気管支喘息モデルマウスにおいて、血清中抗原特異的IgE抗体(抗OVA特異的IgE)量の増加に対するHGFの影響を示した図である。

【書類名】 図面

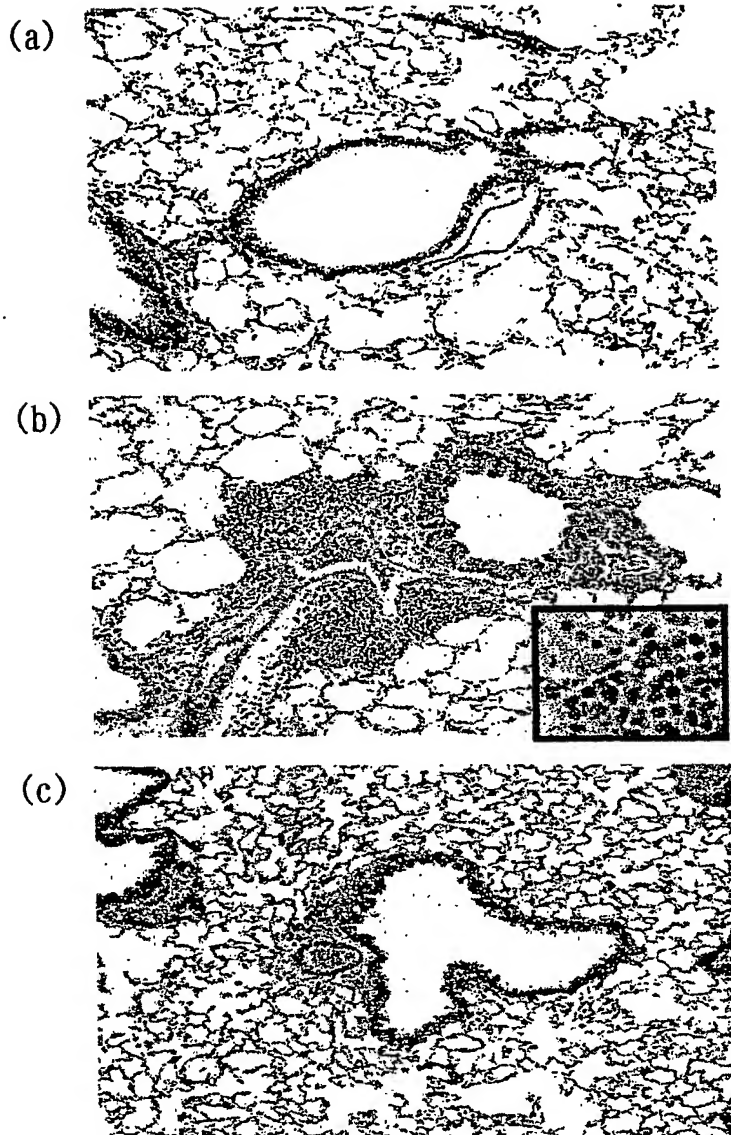
【図 1】



【図 2】

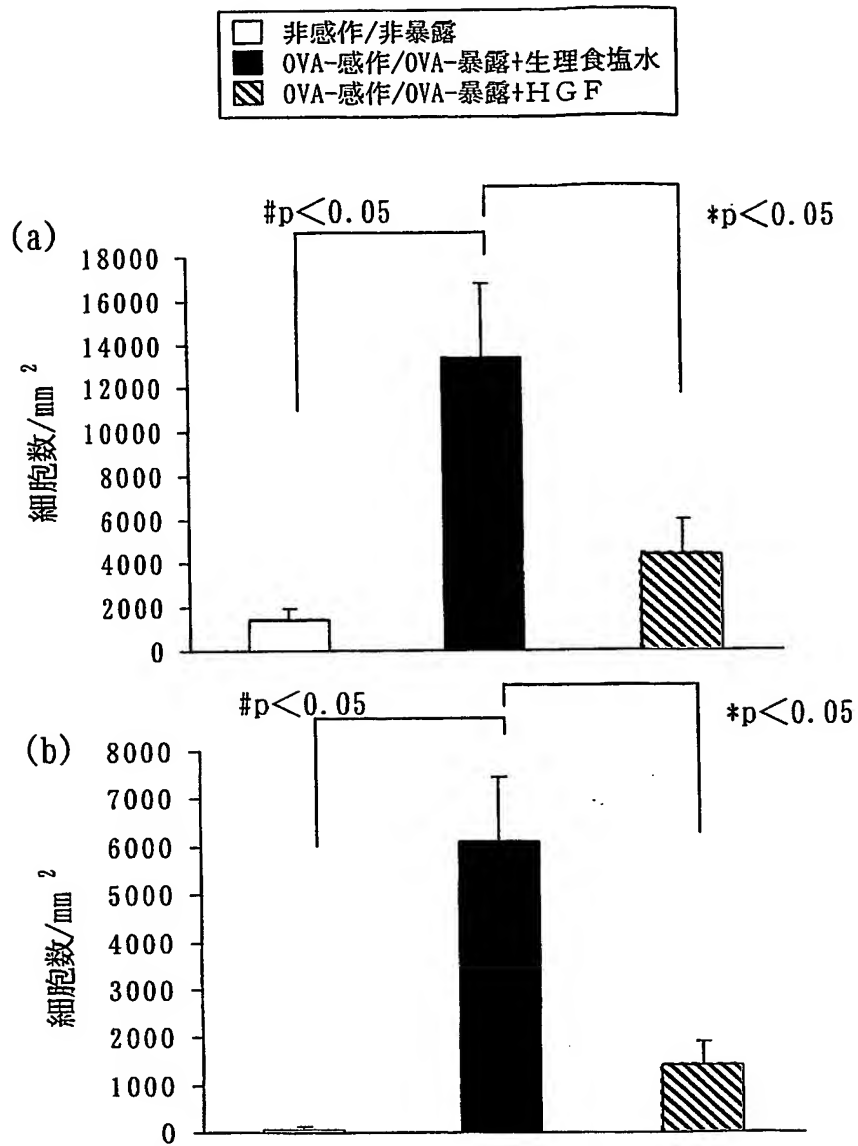


【図 3】

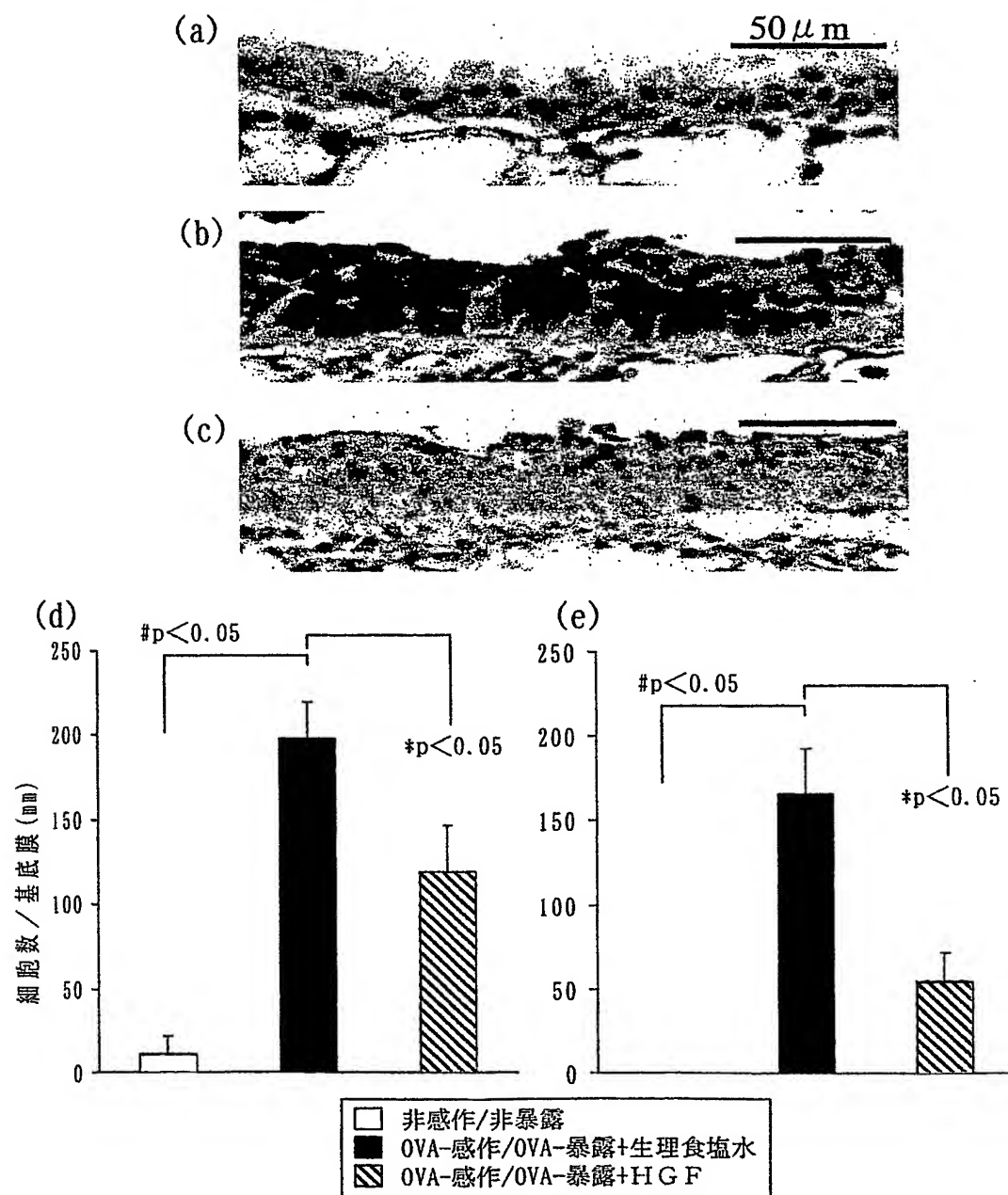




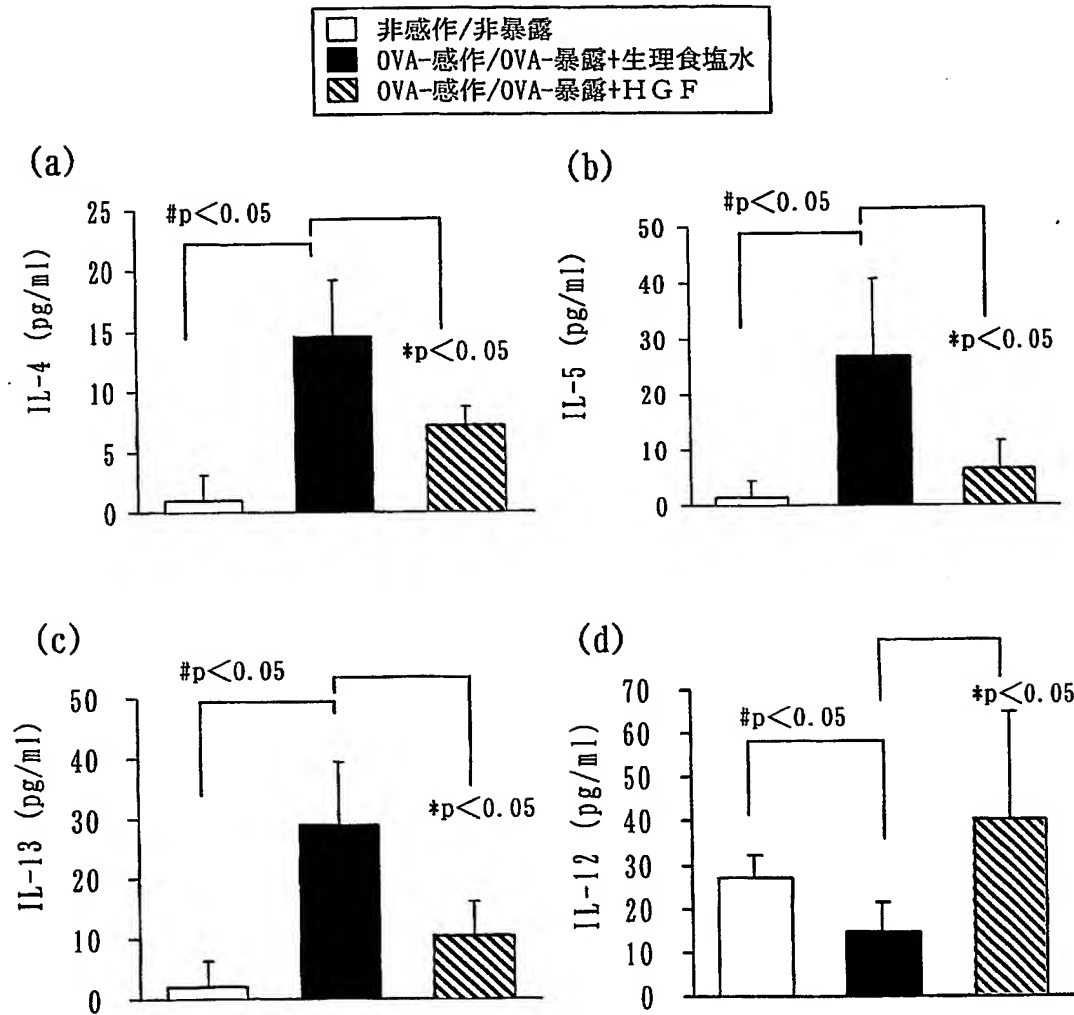
【図 4】



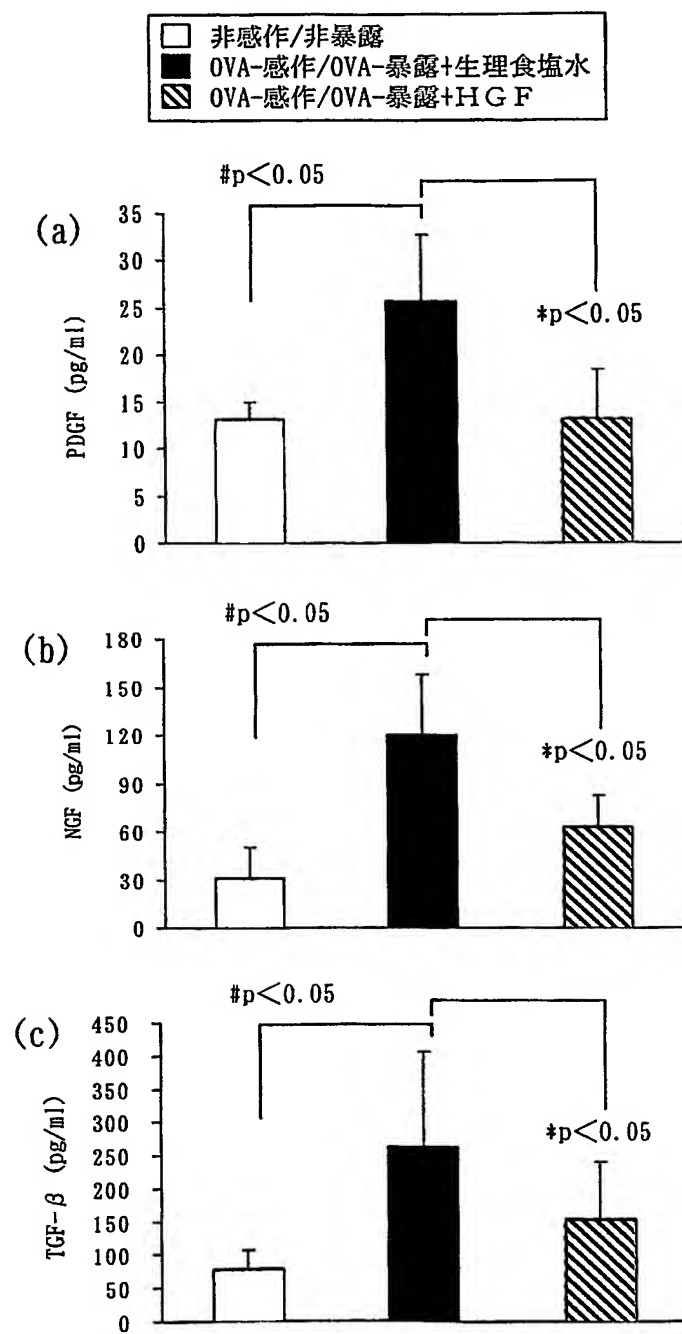
【図5】



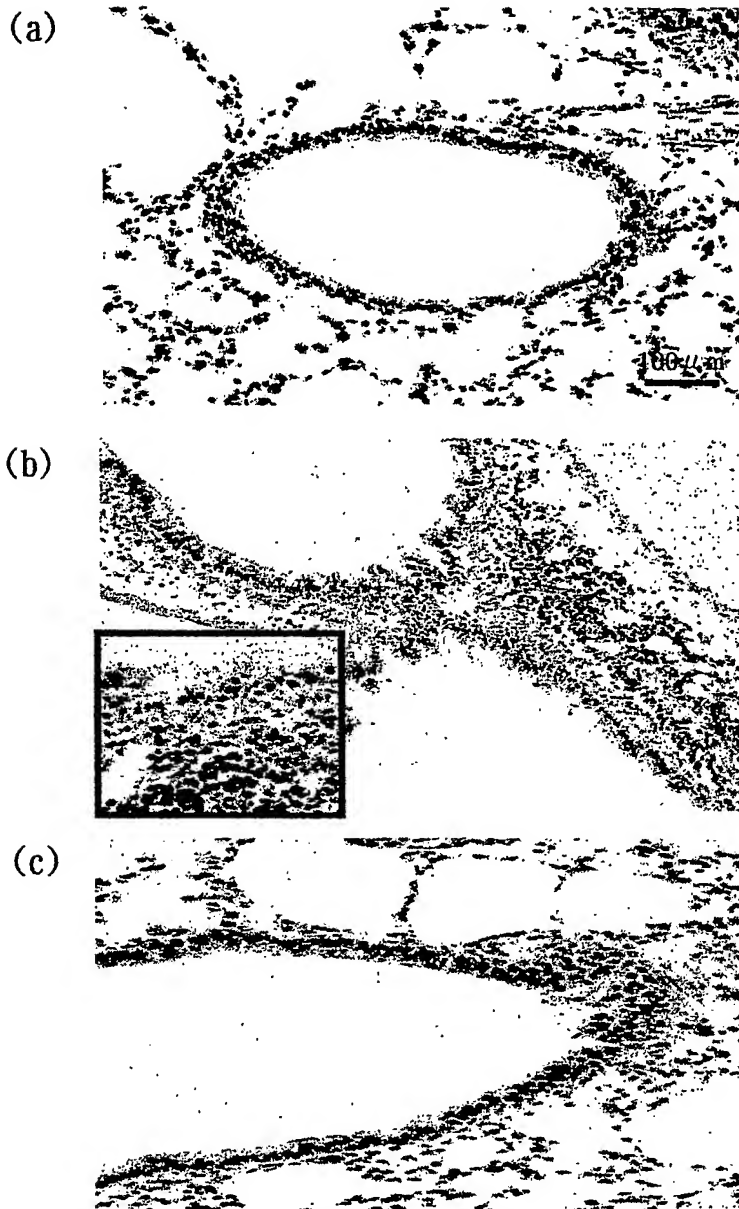
【図 6】



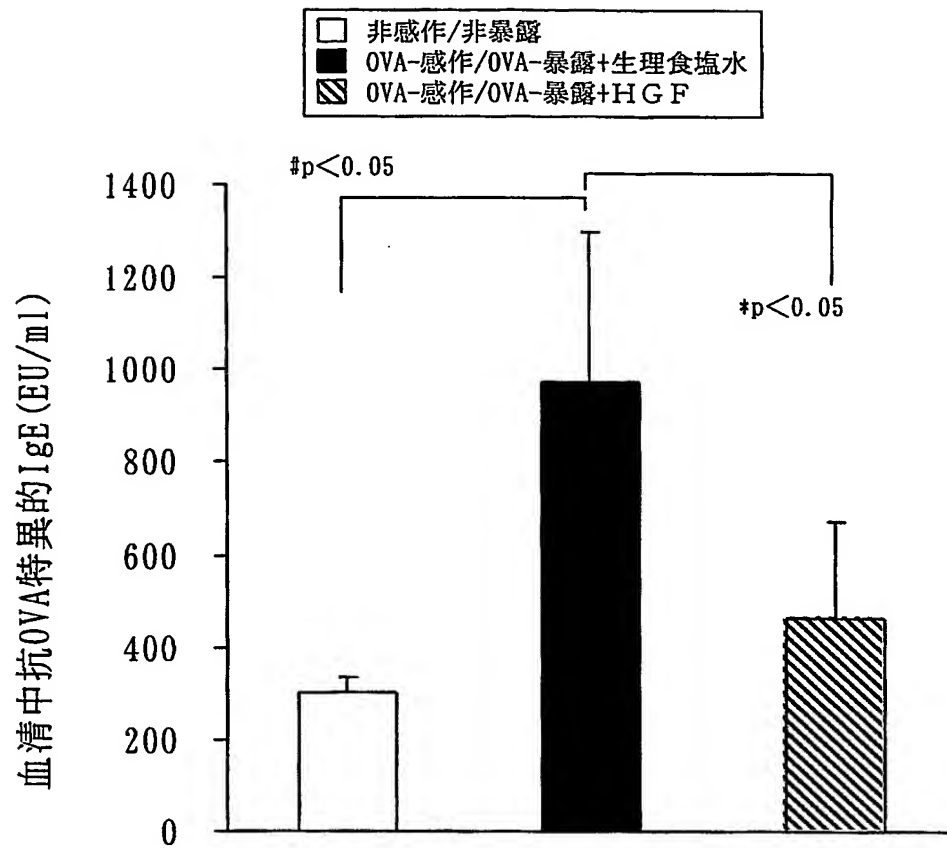
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

本発明は喘息の予防・治療剤、詳しくは、気管支喘息における炎症反応を極めて有効に抑制する HGF を含有し、しかも投与による副作用がなく、生体に安全な喘息の予防・治療剤を提供することを目的とする。

【解決手段】

HGF 又はその塩を有効成分として含有する喘息の予防又は治療剤。

【選択図】 なし

特願 2003-086268

出願人履歴情報

識別番号 [502068908]

1. 変更年月日 2002年10月24日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 大阪府大阪市中央区淡路町2-1-13 弥栄ビル403  
氏 名 クリングルファーマ株式会社
2. 変更年月日 2003年 9月 8日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 大阪府大阪市中央区南船場2-10-27 KAZU ITビ  
ル 605号室  
氏 名 クリングルファーマ株式会社



特願 2 0 0 3 - 0 8 6 2 6 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 9 1 1 1 5 0 7 3 ]

- |          |                         |
|----------|-------------------------|
| 1. 変更年月日 | 1 9 9 7 年 1 1 月 1 8 日   |
| [変更理由]   | 住所変更                    |
| 住 所      | 大阪府高槻市高見台 4 - 1         |
| 氏 名      | 中村 敏一                   |
| 2. 変更年月日 | 2 0 0 3 年 1 2 月 9 日     |
| [変更理由]   | 住所変更                    |
| 住 所      | 京都府京都市左京区岡崎法勝寺町 1 番地の 4 |
| 氏 名      | 中村 敏一                   |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**